

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



**VÝVOJ A OPTIMALIZÁCIA  
CHROMATOGRAFICKÝCH METÓD VHODNÝCH PRE  
BIOANALYTICKÚ APLIKÁCIU**

Dizertačná práca



## **PREHLÁSENIE**

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne, pod vedením svojho školiteľa a konzultantky. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného, alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa 13. 1. 2021

.....

Jaroslav Jenčo



## POĎAKOVANIE

Ďakujem môjmu školiťovi prof. RNDr. Petrovi Solichovi, CSc., za podporu a starostlivosť počas štúdia. Aj keď to so mnou nemal vždy ľahké, dokázal ma pochopiť a viesť mojim postgraduálnym štúdiom. Poďakovanie patrí aj konzultantke doc. RNDr. Lenke Kujovskej Krčmovej, Ph.D., za odborné vedenie, možnosť pracovať v jej kolektíve, v klinickej praxi, vo výskumnom laboratóriu Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Ďakujem aj za jej trpezlivosť a cenné rady v priebehu celého môjho postgraduálneho štúdia. Chcel by som tiež poďakovať celému kolektívu Výskumného laboratória Ústavu Klinickej biochémie a diagnostiky a III. Internej gerontometabolickej klinike za to, že mi umožnili pracovať v modernom laboratóriu s vynikajúcim prístrojovým a laboratórnym vybavením. Poďakovanie patrí aj prof. Dr. Ivo Leito a Dr. Sofji Tšeplevitš, za ich starostlivosť, cenné rady a priateľský prístup počas mojej zahraničnej stáže v Estónsku a za povolenie využiť súbor experimentálnych dát z výskumu, na ktorom som spolupracoval. Chcel by som tiež poďakovať kolektívu katedry Farmaceutickej botaniky, kde bola vypracovaná časť experimentálnych výstupov, za ich podporu, podnety a kolegiálnu pri spísovaní tejto práce.

Ďakujem za finančnú podporu grantovému projektu SVV 260 548. Ďalej by som chcel poďakovať za finančnú podporu a materiálne zabezpečenie projektom: AZV MZ ČR 18-03-00130, PROGRES Q40/12, MH CZ-DRO (UHHK, 00179906), TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235, MOLABI-PL (Reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002682) STARSS (Reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15 003/0000465), spolufinancovanom ERDF, EU-PERSONMED (Reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007441), spolufinancovanom ERDF a štátnym rozpočtom Českej republiky a programu Európskej Únie Erasmus+.

Na záver by som chcel poďakovať svojej rodine, mojej sestre, mame a otcovi, za ich celoživotnú podporu a starostlivosť pri štúdiu a výskumnej činnosti, bez ktorých by moje štúdium nebolo realizovateľné.

Jaroslav Jenčo

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Mgr. Jaroslav Jenčo

**Školitel:** prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

**Konzultant:** doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

**Názov dizertačnej práce:** Vývoj a optimalizácia chromatografických metód vhodných pre klinickú aplikáciu

Predkladaná dizertačná práca je rozdelená do niekoľkých častí, kopírujúcich pracoviská, na ktorých som postupne pracoval. Zjednocujúcim prvkom je vývoj a optimalizácia metód na prípravu vzoriek biologicky aktívnych látok a ich následná analýza za pomoci separačných metód.

V teoretickej časti sú charakterizované cieľové látky, z biochemického, fyzikálno - chemického a analytického hľadiska. Sú v nej popísané základné charakteristiky extrakčných postupov a prehľad metód používaných na stanovenie popísaných látok v biologickom materiáli.

V prvej, hlavnej experimentálnej časti, sa dizertačná práca zaoberá vývojom, optimalizáciou a validáciou analytickej metódy na chromatografickú analýzu vitamínu B1, jeho biologicky aktívnych foriem a aktívnej formy vitamínu B6 v krvi. Je v nej popísaný výber techník úpravy vzoriek, samotná optimalizácia cieľovej metodiky a dôvody jej výberu. V ďalšej časti sa práca zaoberá samotným vývojom chromatografickej metódy a jej aplikáciou na vybrané vzorky biologického materiálu, kde došlo k overeniu vyvinutej metódy.

Ďalšia časť tejto dizertačnej práce sa zaoberá systematickým prístupom na predikciu rozdelenia neznámych látok v komplexných zmesiach, do dvoch kvapalných fáz, pomocou techniky extrakcie z kvapaliny do kvapaliny. Je v nej popísaná problematika vývoja prediktívnej metodológie, ako nástroja schopného značného zjednodušenia optimalizácie extrakčného postupu, najmä pri látkach s neznámymi vlastnosťami, alebo zmesiach látok s neznámym zložením. Cieľom tejto práce je vyvinutý algoritmus, schopný na základe malého množstva vstupných údajov, relatívne presne odhadovať správanie neznámych látok počas separácie. Na vývoji tejto metodiky som sa behom svojho doktorského štúdia podieľal v rámci mojej zahraničnej stáže.

V poslednej časti experimentálnej práce je popísaný vývoj rýchlej skriningovej metódy k posúdeniu konštitúcie alkaloidov v rastlinných vzorkách. Metóda bola vyvinutá tak, aby bola schopná separovať analyty alkaloidného pôvodu i v prípadoch, že sú ich vlastnosti, štruktúra a molekulová hmotnosť neznáme. Je tiež vhodná na monitorovanie čistoty upravených extraktov a posúdenie ich molekulovej hmoty. Poskytuje dobré východisko pri prenose metódy z analytických podmienok na preparačnú chromatografiu. Na vývoji tejto metodiky som sa v priebehu doktorského štúdia podieľal v rámci môjho pôsobenia ako akademický pracovník na katedre Farmaceutickej botaniky, Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Prehľad ostatných prác a výstupov je uvedený na konci predkladanej práce.

## **ABSTRACT**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department:** Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Mgr. Jaroslav Jenčo

**Supervisor:** prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

**Consultant:** doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

**Title of dissertation thesis:** Development and optimization of chromatographic methods suitable for clinical application

The presented dissertation thesis is divided into several parts, copying the workplaces, which I gradually worked on. The unifying element is the development and optimization of methods for the preparation of samples of biologically active substances and their subsequent analysis using separation methods.

The theoretical part characterizes the target substances, from a biochemical, physicochemical, and analytical point of view. It describes the basic characteristics of extraction procedures and presents an overview of the methods used to determine the substances described in the thesis.

In the first, main experimental part, of the dissertation thesis the development, optimization, and validation of an analytical method for chromatographic analysis of vitamin B1, its biologically active forms and the active form of vitamin B6 in blood is described. It illustrates the selection of sample preparation techniques, the optimization of the target methodology and the reasons for its selection. In the next part, the work deals with the development of the chromatographic method and its application to selected samples of biological material, where the developed method was verified.

The next part of this work explains a systematic approach to predict the distribution of unknown substances in complex mixtures into two liquid phases, using the technique of liquid-to-liquid extraction. It depicts the issue of the development of predictive methodology, as a tool capable of significantly simplifying the optimization of the extraction process, especially for substances with unknown properties, or mixtures of substances with unknown composition. The goal of this work is to develop an algorithm capable of relatively accurately estimating the behavior of unknown substances during separation, based on a small amount of input data. During my doctoral studies, I participated in the development of this methodology as part of my internship abroad.



The last part of the experimental work describes the development of a rapid screening method to assess the constitution of alkaloids in plant samples. The method has been developed to be able to separate analytes of alkaloid origin even when their properties, structure and molecular weight are unknown. It is also suitable for the monitoring of the purity of treated extracts and assessing their molecular weight. It provides a good starting point for transferring of the method from analytical conditions to preparative chromatography. During my doctoral studies, I participated in the development of this methodology as an academic worker at the Department of Pharmaceutical botany, Faculty of Pharmacy, Charles University in Hradec Králové.

An overview of other works and outputs are given at the end of the presented work.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. CIELE PRÁCE .....</b>	<b>3</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Stanovované vitamíny .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.1 Vitamín B1 .....</b>	<b>6</b>
3.1.1.1 <i>Fyzikálno-chemické vlastnosti tiamínu a jeho vitamérov .....</i>	<i>6</i>
3.1.1.2 <i>Biochemické vlastnosti vitamérov tiamínu .....</i>	<i>10</i>
<b>3.1.2 Vitamín B6 .....</b>	<b>12</b>
3.1.2.1 <i>Fyzikálno-chemické vlastnosti pyridoxal-5-fosfátu .....</i>	<i>13</i>
3.1.2.2 <i>Biochemické a metabolické vlastnosti pyridoxal-5-fosfátu .....</i>	<i>15</i>
<b>3.1.3 Analýza vitamínov B1 a B6 pomocou kvapalinovej chromatografie.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.4 Metódy na stanovenie vitamínu B1.....</b>	<b>17</b>
3.1.4.1 <i>Chromatografia na normálnej fáze.....</i>	<i>18</i>
3.1.4.2 <i>Chromatografia pomocou hydrofilných interakcií (HILIC) .....</i>	<i>19</i>
3.1.4.3 <i>Chromatografia na reverznej fáze .....</i>	<i>20</i>
3.1.4.4 <i>Plynová chromatografia .....</i>	<i>21</i>
3.1.4.5 <i>Hyphenáčné separačné techniky.....</i>	<i>21</i>
3.1.4.6 <i>Hmotnostná spektrometria a budúce trendy v analýze tiamínu.....</i>	<i>22</i>
<b>3.2 Metódy úpravy biologického materiálu k chromatografickej analýze.....</b>	<b>23</b>
3.2.1 <i>Riedenie vzoriek.....</i>	<i>24</i>
3.2.2 <i>Homogenizácia .....</i>	<i>25</i>
3.2.3 <i>Filtrácia, sedimentácia a centrifugácia.....</i>	<i>28</i>
3.2.4 <i>Odstránenie a precipitácia proteínov .....</i>	<i>29</i>
3.2.5 <i>Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny .....</i>	<i>32</i>
3.2.6 <i>Extrakcia pomocou pevnej fázy .....</i>	<i>35</i>
3.2.7 <i>Derivatizácia.....</i>	<i>38</i>
<b>4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Vývoj metódy na klinické monitorovanie metabolitov vitamínu B1 a statusu vitamínu B6 v plnej krvi pomocou kvapalinovej chromatografie.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.1 Úvod do problematiky a cieľ práce .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2 Prístrojové vybavenie, chemikálie a použitý biologický materiál.....</b>	<b>41</b>
4.1.2.1 <i>Chromatografický systém .....</i>	<i>41</i>

4.1.2.2	<i>Laboratórne vybavenie</i>	41
4.1.2.3	<i>Štandardy a chemikálie</i>	42
4.1.2.4	<i>Príprava štandardných roztokov a derivatizačných činidiel</i>	42
4.1.2.5	<i>Použitý biologický materiál</i>	43
<b>4.1.3</b>	<b>Vývoj HPLC-FLD metódy</b>	<b>43</b>
4.1.3.1	<i>Optimalizácia chromatografických podmienok</i>	43
4.1.3.2	<i>Úprava vzorky pred analýzou</i>	49
<b>4.1.4</b>	<b>Finálne podmienky analýzy</b>	<b>54</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Validácia metódy</b>	<b>57</b>
4.1.5.1	<i>Vybrané validačné parametre</i>	57
<b>4.1.6</b>	<b>Aplikácia metódy na reálne vzorky</b>	<b>62</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Záver</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>Systematická optimalizácia extrakcie z kvapaliny do kvapaliny, na izoláciu neznámych látok</b>	<b>64</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Úvod do problematiky a cieľ práce</b>	<b>64</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Prístrojové vybavenie, chemikálie a použitý biologický materiál</b>	<b>66</b>
4.2.2.1	<i>Chromatografický systém</i>	66
4.2.2.2	<i>Laboratórne vybavenie</i>	66
4.2.2.3	<i>Štandardy a chemikálie</i>	66
<b>4.2.3</b>	<b>Experimentálna metodológia</b>	<b>68</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Chromatografická analýza</b>	<b>70</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Optimalizácia experimentálnych podmienok</b>	<b>72</b>
4.2.5.1	<i>Optimalizácia pH vodných roztokov</i>	72
4.2.5.2	<i>Dĺžka ekvibrácie</i>	73
4.2.5.3	<i>Teplotné podmienky</i>	74
4.2.5.4	<i>Interakcie medzi stanovňovanými látkami</i>	74
<b>4.2.6</b>	<b>Výsledky a diskusia</b>	<b>76</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Záver</b>	<b>80</b>
<b>4.3</b>	<b>Vývoj metódy na screening alkaloidov v extraktoch prírodného pôvodu</b>	<b>81</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Úvod do problematiky a cieľ práce</b>	<b>81</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Prístrojové vybavenie a chemikálie</b>	<b>82</b>
4.3.2.1	<i>Chromatografický systém</i>	82
4.3.2.2	<i>Štandardy a chemikálie</i>	83
<b>4.3.3</b>	<b>Vývoj HPLC-MS metódy</b>	<b>84</b>

4.3.3.1	<i>Optimalizácia chromatografických podmienok</i> .....	86
4.3.3.2	<i>Optimalizácia podmienok hmotnostnej detekcie</i> .....	88
4.3.3.3	<i>Úprava vzorky pred analýzou</i> .....	90
4.3.4	<b>Finálne podmienky analýzy</b> .....	90
4.3.5	<b>Aplikácia metódy na reálne vzorky</b> .....	91
4.3.6	<b>Záver</b> .....	93
5.	<b>ZÁVER</b> .....	94
6.	<b>PREHLAD PUBLIKOVANÝCH PRÁC A PRÍSPEVKOV</b> .....	96
6.1	<b>Publikácie</b> .....	96
6.2	<b>Prednášky</b> .....	98
6.3	<b>Plagátové prezentácie</b> .....	99
7.	<b>ÚČASŤ NA PROJEKTOCH A STÁŽACH</b> .....	100
7.1	<b>Grantové projekty</b> .....	100
7.2	<b>Absolvované stáže</b> .....	100
8.	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b> .....	101
9.	<b>PRÍLOHY</b> .....	115
9.1	<b>Príloha I</b> .....	116
9.2	<b>Príloha II</b> .....	128
9.3	<b>Príloha III</b> .....	133
9.4	<b>Príloha IV</b> .....	142
9.5	<b>Príloha V</b> .....	154
9.6	<b>Príloha VI</b> .....	164
9.7	<b>Príloha VII</b> .....	168

## **ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK**

ADP	- Adenozín difosfát
AMP	- Adenozín monofosfát
ATP	- Adenozín trifosfát
BCODC	- Rozvetvený reťazec 2-oxo kyslého dehydrogenázového komplexu
C18	- Oktadecilsilanová skupina
CE	- Kapilárna elektroforéza
CSF	- Mozgomiešny mok
DAD	- detektor s diódovým poľom
DGKL	- Nemecká spoločnosť pre klinickú chémiu a laboratórne lekárstvo
DLLME	- disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny
EMA	- Európska medicínska agentúra
EME	- elektromembránová extrakcia
FDA	- Úrad pre potraviny a liečivá
FIA	- prietoková injekčná analýza
GC-MS	- plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou
GLUT	- Glukózový univerzálny transportér
HACL1	- 2-hydroxyacyl-koenzým A-lyáza 1
HF-LPME	- mikroextrakcia z kvapalnej fázy pomocou dutého vlákna
HILIC	- Hydrofilná interakčná chromatografia
HPLC	- Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
Log D	- Hodnota distribučného koeficientu
LLE	- Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny
LOO	- krížová validácia pomocou vynechania jednej premennej
MIP	- polyméry s molekulovými odtlačkami
NIST	- Národný inštitút pre štandardy a technológie
OGDHC	- Oxoglutarát dehydrogenázový komplex
P-5-P	- Pyridoxal-5-fosfát
PALME	- paralelná extrakcia pomocou umelej kvapalnej membrány
PDA	- detektor s diódovým poľom
PDHC	- Pyruvát dehydrogenázový komplex
RFC1	- Redukovaný folátový prenášač
SDME	- mikroextrakcia na jednej kvapke

SEKK - Systém externej kontroly kvality  
SFC – superkritická kvapalinová chromatografia  
SLE – pevnou látkou podporená extrakcia z kvapaliny do kvapaliny  
SPE - Extrakcia pomocou pevnej fázy  
SPME - Mikroextrakcia pomocou pevnej fázy  
TDP - Tiamín difosfát  
Th - Tiamín  
THTR1 - Tiamínový transportér 1  
THTR2 - Tiamínový transportér 2  
TK - Transketoláza  
TCL – Chromatografia na tenkej vrstve  
TMP - Tiamín monofosfát  
TMPase - Tiamín monofosfatáza  
TPK - Tiamín pyrofosfokináza  
TPPase - Tiamín difosfatáza  
UHPLC - Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia  
UK NEQAS - Národné externé služby posudzovania kvality vo Veľkej Británii  
UV/VIS - Ultrafialová a viditeľná oblasť spektra

## ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obrázok 1</b> Štruktúra tiamínu .....	6
<b>Obrázok 2</b> Percentuálna distribúcia mikroduhov tiamínu v rozdielnom pH.....	7
<b>Obrázok 3</b> Štruktúra tiamín monofosfátu .....	8
<b>Obrázok 4</b> Percentuálna distribúcia mikroduhov tiamín monofosfátu v rozdielnom pH .....	8
<b>Obrázok 5</b> Štruktúra tiamín difosfátu .....	9
<b>Obrázok 6</b> Percentuálna distribúcia mikroduhov tiamín difosfátu v rozdielnom pH ....	9
<b>Obrázok 7</b> Metabolizmus a distribučná dráha tiamínu v organizme .....	11
<b>Obrázok 8</b> Štruktúra pyridoxal-5-fosfátu .....	14
<b>Obrázok 9</b> Percentuálna distribúcia mikroduhov pyridoxal-5-fosfátu v rozdielnom pH .....	14
<b>Obrázok 10</b> Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny v závislosti od pomeru jednotlivých rozpúšťadiel .....	32
<b>Obrázok 11</b> Základná schéma SPE extrakcie .....	35
<b>Obrázok 12</b> Názorná ukážka typov SPE extrakcie.....	37
<b>Obrázok 13</b> Porovnanie metódy na štandardoch (A) a biologickom materiáli (B).....	44
<b>Obrázok 14</b> Porovnanie jednotlivých stacionárnych fáz .....	46
<b>Obrázok 15</b> Príklad separácie pomocou finálnej metódy na vzorke plnej krvi.....	48
<b>Obrázok 16</b> Porovnanie salting out LLE na zmesi štandardov (vľavo) s vybranou vzorkou plnej krvi u pacienta (vpravo).....	51
<b>Obrázok 17</b> Porovnanie komerčne dostupných mikroskúmviek .....	52
<b>Obrázok 18</b> Aktívne miesta väzby TDP, TMP a Th na plazmatických proteínoch .....	53
<b>Obrázok 19</b> Schéma extrakčného postupu .....	56
<b>Obrázok 20</b> Stabilita derivatizovaného extraktu po opakovaných stanoveniach.....	61
<b>Obrázok 21</b> Štruktúry látok využitých pri vývoji empirického prediktívneho modelu .....	68
<b>Obrázok 22</b> Chromatogram ekvilibrovanej organickej a vodnej fázy, po extrakcii viacložkového roztoku.....	71
<b>Obrázok 23</b> Príklad interakcie jednej látky v rôznych rozpúšťadlách.....	75
<b>Obrázok 24</b> Interakcie medzi hodnotami logP (toluén / 0,1 M HCl) a logP v troch ďalších pároch rozpúšťadiel (X) .....	77

<b>Obrázok 25</b> Výkonnosť modelu s niektorými neidentifikovanými zložkami kolofónie, oleja z Černušky siatej a cédrového oleja .....	78
<b>Obrázok 26</b> Distribúcia strednej kvadratickej odchýlky (RMSE) v LOO testoch, ako funkcia počtu vstupných hodnôt logD/logP (N), kyslosti (pKa) zlúčenín a párov rozpúšťadiel .....	79
<b>Obrázok 27</b> Kolóny použité na chromatografickú analýzu .....	87
<b>Obrázok 28</b> Chromatogram delenia štandardných látok alkaloidov .....	88
<b>Obrázok 29</b> Porovnanie zmeny parametrov hmotnostnej detekcie, na priemernú intenzitu signálov .....	89
<b>Obrázok 30</b> GC-MS chromatogram alkaloidného extraktu z rastliny Zephyrantes Citrina v porovnaní s TLC .....	91
<b>Obrázok 31</b> LC-MS Chromatogram alkaloidného extraktu z rastliny Zephyrantes Citrina .....	92
<b>Obrázok 32</b> Chromatogram frakcionácie purifikovaného haemantidínu z extraktu rastliny Zephyrantes Citrina na získanie čistých frakcií jeho izomérov v porovnaní s chirálnou TLC. ....	92



## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tabuľka 1</b> Fyzikálno-chemické vlastnosti tiamínu .....	6
<b>Tabuľka 2</b> Fyzikálno-chemické vlastnosti TMP .....	8
<b>Tabuľka 3</b> Fyzikálno-chemické vlastnosti TDP .....	9
<b>Tabuľka 4</b> Biochemické vlastnosti vitamérov tiamínu .....	12
<b>Tabuľka 5</b> Fyzikálno-chemické vlastnosti P-5-P .....	14
<b>Tabuľka 6</b> Vybrané spôsoby homogenizácie vzoriek .....	27
<b>Tabuľka 7</b> Prehľad počiatočných podmienok separácie .....	44
<b>Tabuľka 8</b> Prehľad použitých kolón.....	47
<b>Tabuľka 9</b> Finálne podmienky separácie .....	48
<b>Tabuľka 10</b> Účinnosti deproteinácie v ľudskej plazme na celkový obsah bielkovín podľa [77] .....	50
<b>Tabuľka 11</b> Porovnanie zmeny pH krvi po prídavku 0,1M HCl.....	52
<b>Tabuľka 12</b> Vybrané parametre testu spôsobilosti systému, selektivity metódy a štúdie špecificity .....	57
<b>Tabuľka 13</b> Determinanty kalibračnej krivky pre P5P, TDP, TMP a Th .....	59
<b>Tabuľka 14</b> Porovnanie hodnôt SD a RSD medzi jednotlivými analýzami.....	59
<b>Tabuľka 15</b> Výťažnosť P5P, TDP, TMP and Th .....	60
<b>Tabuľka 16</b> Porovnanie hodnôt pred a po podaní tiamínu.....	62
<b>Tabuľka 17</b> Vplyv dĺžky agitácie a času medzi agitáciou a chromatografickou analýzou, na výsledok merania .....	73
<b>Tabuľka 18</b> Prehľad základných štruktúrnych typov alkaloidov čeľade Amarylkovité a ich základné vlastnosti, vypočítané podľa programu ChemDraw .....	85

# 1. ÚVOD

Separčné metódy v klinických laboratóriách zohrávajú kľúčovú úlohu v identifikácii a monitorovaní hladín biologicky významných látok. Práve vďaka rozvoju diagnostických postupov a novým trendom v chromatografii sa stále častejšie uplatňujú, ako hlavný analytický nástroj k analýze väčšieho množstva látok v jednej analýze, a tým umožňujú rýchle a presné zhodnotenie zdravotného stavu. Poskytujú veľké množstvo relevantných informácií, odrážajúcich fyziologické a patofyziologické deje v organizme. Robustnosť, citlivosť a opakovateľnosť meraní, spolu s rýchlou analýzou a relatívne nízkou cenou spôsobujú, že sa upúšťa od konvenčných enzymatických a mikrobiálnych testov. Veľká výhoda separačných metód je v možnosti kvalitatívneho a kvantitatívneho stanovenia viacerých látok v jednom kroku, na jednom prístroji. Spolu s malou spotrebou biologického materiálu a možnosťou automatizácie úpravy vzoriek a ich vyhodnocovania. To im poskytuje príležitosť pre rozvoj a možnosť nahrádzať dlhodobo konvenčne používané metódy.

Trendmi v kvapalinovej chromatografii, najmä v klinických laboratóriách, je skracovanie času analýz, paralelné stanovenia viacerých látok v jednom kroku a zníženie ekonomickej a časovej náročnosti jednotlivých pre- a post- analytických dejov, ale i analýzy samotnej. Z tohto dôvodu dochádza k vývoju nových a úpravám už existujúcich stacionárnych fáz, modernizácii prístrojového vybavenia a vývoju nových miniaturizovaných extrakčných techník. Účinným nástrojom sa stáva aj chemometrická predikcia, ktorá má napomôcť pri správnom výbere a optimalizácii separačného postupu a úpravy vzorky.

Bioanalytický postup správnej laboratórnej praxe kriticky závisí od zaobchádzania s údajmi, úpravou vzorky, optimalizácie a vhodného nastavenia podmienok separácie. Extenzívna kontrola validačných charakteristík sa vďaka rozvoju informačných technológií a počítačového štatistického spracovania dát výrazne zjednodušila.

Tandemové techniky, ako kvapalinová chromatografia kombinovaná s hmotnostnou spektrometriou, predstavujú účinný a efektívny nástroj klinického monitorovania metabolicky aktívnych látok. Jedná sa o najrýchlejšie rastúcu detekčnú techniku. Vyniká vysokou citlivosťou a špecifitou detekcie. Je, okrem iného, schopná poskytnúť základné štruktúrne informácie o stanovovaných látkach. V mnohých prípadoch je však využiteľnosť hmotnostnej detekcie obmedzená, kvôli vyššej finančnej náročnosti a obmedzeniam pri voľbe vhodného separačného prostredia. K dosiahnutiu

dostačujúcej separácie niektorých látok, je totiž nutné použiť pufrý, alebo iné zložky mobilných fáz, derivatizačných a iónovo párových činidiel, ktoré nie sú kompatibilné s danou inštrumentáciou. Zásadným faktorom pri použití hmotnostnej detekcie je aj schopnosť obsluhujúceho personálu interpretovať analýzu a výsledky. Je preto potrebné, aby bola obsluha primerane zaškolená. Ďalším limitujúcim faktorom je obmedzenie vo výbere adekvátneho analyzovaného materiálu a techniky vhodnej k jeho úprave tak, aby nedochádzalo k interferujúcemu účinku matrice. Niektoré látky bez dodatočných úprav zle ionizujú. Je potrebné použiť kompatibilné postupy na úpravu vzoriek, aby sa zabránilo matricovým efektom, a aby sa odstránili interferencie spôsobené ďalšími komponentami vzorky počas ionizačného procesu. Z toho dôvodu klasické detekčné metódy, využívajúce spektrofotometriu v ultrafialovej a viditeľnej oblasti, elektrochemickú, alebo fluorescenčnú detekciu, komplementárne dopĺňajú detekčné portfólio a zvyšujú využiteľnosť chromatografických techník vo výskume, ale aj v rutínnej laboratórnej prevádzke.

## 2. CIELE PRÁCE

Hlavným cieľom predkladanej dizertačnej práce bolo vyvinutie, optimalizácia a validácia separačného a extrakčného postupu na stanovenie vitamínu B1 - tiamínu (Th) a jeho biologicky aktívnych vitamérov, tiamín difosfátu (TDP), tiamín monofosfátu (TMP) a biologicky aktívnej formy vitamínu B6 – pyridoxal-5-fosfátu (P-5-P), v biologickom materiáli. Pri vývoji bol kladený dôraz na rýchlosť separácie, jednoduchosť v prístrojovom vybavení a použiteľnosť v klasických laboratórnych podmienkach. Vyvinutý postup úpravy a spôsob analýzy boli koncipované tak, aby boli vhodné pre aplikáciu v následnom klinickom výskume, pri rutinej analýze veľkého počtu vzoriek. Daná metóda vznikla na podnet a v spolupráci s III. internou gerontometabolickou klinikou Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Na využitie metódy v praxi bolo nutné inštrumentálnu metódu validovať podľa platných noriem a overiť jej použiteľnosť analýzou reálnych vzoriek biologického materiálu.

Okrem vývoja metódy, ako jedným z cieľov, bola aj literárna rešerš danej problematiky, ktorá mala za úlohu sumarizovať doterajšie informácie o vlastnostiach analytov, ich biologickom význame v organizme, podmienkach analýzy a prístrojovom vybavení, ktoré bolo použité k ich analýze a porovnanie doteraz používaných metód.

Ďalšou úlohou, ktorou sa táto dizertačná práca zaoberá, je systematická optimalizácia postupu extrakcie z kvapaliny do kvapaliny (LLE), k izolácii neidentifikovaných látok, ktorá bola zadaná a vznikla v spolupráci s Univerzitou v Tartu a farmaceutickou firmou Pfizer (Groton, Connecticut, Spojené štáty americké). Hlavným cieľom úlohy bolo vyvinúť prediktívny mechanizmus na selektívnu extrakciu, alebo prečistenie vzorky s neznámym obsahom neidentifikovaných látok. Tento mechanizmus bol následne overený štatistickou analýzou výsledných hodnôt a porovnaný s tabuľkovými hodnotami a s komerčne dostupným softvérom.

Posledným cieľom dizertačnej práce bolo vyvinúť a optimalizovať chromatografickú metódu na sledovanie kompozície alkaloidných extraktov. Zásadným faktorom separácie musela byť možnosť následnej škálovateľnosti tak, aby bola využiteľná aj v preparatívnom chromatografickom móde, a mohla tak slúžiť k frakcionácii extraktu. Musela však byť aj dostatočne citlivá na to, aby bolo možné sledovať aj minoritné komponenty matrice. Táto úloha vychádzala z potrieb Katedry farmaceutickej botaniky, Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

#### 3.1 Stanovované vitamíny

Vitamíny sú rôznorodou skupinou chemických látok. Pre správnu funkciu organizmu majú esenciálny význam. Navzájom však majú málo spoločných chemických vlastností a metabolických funkcií. Nutrične tvoria súdržnú skupinu organických zlúčenín - mikronutrientov, ktoré sú potrebné v potrave v malých množstvách (mikrogramy až miligramy za deň), na udržanie fyziologických dejov v organizme a normálnu metabolickú integritu. Odlišujú sa preto od nevyhnutných minerálov, stopových prvkov, esenciálnych aminokyselín a mastných kyselín, ktorých denný príjem je potrebný vo väčších množstvách. U niekoľkých druhov vitamínov existuje skupina chemicky príbuzných látok, ktoré vykazujú rovnakú biologickú aktivitu, pretože sú buď konvertované na rovnaký biologicky aktívny metabolit, alebo majú dostatočnú štruktúrnu podobnosť s hlavným vitamínom, a tým i podobnú aktivitu. Tieto látky sa kolektívne nazývajú vitamérmí. Okrem ich systematickej chemickej nomenklatúry majú vitamíny a vitaméry aj zdanlivo nelogický systém akceptovaného triviálneho pomenovania, ktorý vyplýva z histórie ich objavovania.

Nutričné deficiencie vitamínov boli pozorované u ľudí a zvierat už po stáročia. Už Vedder v roku 1912 vysledoval popis príznakov podobný vtedy popisovanému ochoreniu beriberi od roku 2697 p.n.l., v Číne strednej doby bronzovej. Až Eijkman a Grijns na konci 19. storočia poukázali na spojitosť medzi zložkami nachádzajúcimi sa v čiastočkách ryžovej otruby a oplodí so zníženým výskytom polyneurotického ochorenia beriberi. Casimir Funk na to v roku 1912 izoloval vo vode rozpustnú antiberiberickú zlúčeninu, v čiastočne vyčistenom stave, s názvom aneurín a v článku o etiológii deficienčných chorôb, uverejnenom v roku 1912, prvýkrát použil termín „vitamín“. Pojem vitamín bol odvodený z dvoch slov, latinského „vitae“ – život a anglického „amine“ – amín, čo malo poukazovať na prítomnosť dusíkatej skupiny. V rovnakom roku publikoval výsledky experimentálnej práce aj anglický biochemik Frederick Gowland Hopkins, ktorý skúmal vplyv potravy s definovaným obsahom tukov, bielkovín minerálnych solí a uhlíkovodíkov na vývoj potkanov. Ich zdravotný stav sa, aj napriek adekvátnej výžive, zhoršoval a rast stagnoval, avšak po pridaní malého množstva mlieka do stravy došlo k obnoveniu a udržiavaniu normálneho rastu. Navrhol, že mlieko obsahuje jeden alebo viac doplnkových rastových faktorov - základných živín prítomných

v malom množstve, pretože pridanie už malého množstva mlieka do stravy bolo dostatočné na udržanie normálneho rastu a ich rozvoj.

Keď sa zistilo, že mlieko obsahovalo viac ako jeden doplnkový potravinový faktor, boli tieto vitamíny pomenované A (vitamín, ktorý je rozpustný v tukoch a nachádza sa v smotane) a B (vitamín, ktorý je rozpustný vo vode a nachádza sa v srvátke). Toto rozdelenie na vitamíny rozpustné v tukoch a vo vode sa stále používa. Deriváty v tuku rozpustných derivátov vitamínov A a K a niektorých vo vode rozpustných vitamínov B a vitamínu C boli vtedy vyvinuté na terapeutické použitie a používané ako prídavné látky v potravinách. V priebehu vývoja vitamínov sa zistilo, že „vitamínový faktor B“ pozostáva z niekoľkých chemicky a fyziologicky odlišných zlúčenín. Pred chemickou identifikáciou dostali logickú sériu alfanumerických mien: B1, B2 a tak ďalej. Boli taktiež postulované definície charakterizujúce látky ako vitamíny.

Vitamín je definovaný ako:

- organická látka preukázateľne odlišná od tukov, uhľovodíkov a bielkovín,
- je prirodzenou zložkou stravy, v ktorej sa vyskytuje v malých množstvách,
- je esenciálna, obvykle tiež v malých dávkach, pre normálne fyziologické funkcie, (napr. udržiavanie, rast, vývoj a/alebo produkcia látok v organizme),
- plní preventívnu funkciu pred špecifickým deficienčným syndrómom, ktorý sa vyskytuje pri jej absencii, alebo nedostatku,
- nie je syntetizovaná samotným organizmom v adekvátnom množstve, ktoré by spĺňovalo fyziologické požiadavky.

Napriek jasnej definícii existuje niekoľko látok, ktoré aj napriek nesplňajúcim kritériám, ostali zaradené medzi vitamíny. Jedná sa predovšetkým o vitamín D – cholekalciferol a ergokalciferol a vitamín B3 - niacín, ktoré síce môžu byť syntetizované v ľudskom organizme, ale sú stále klasifikované ako vitamíny z historických dôvodov. V medziach súčasného poznania, na udržanie homeostázy organizmu sa predpokladá nevyhnutnosť prinajmenšom 13 vitamínov, z ktorých väčšina je prijímaná pri konzumácii vyváženej rastlinnej a živočíšnej potravy.

V prvej polovici dvadsiateho storočia boli vitamínové deficiencie a poruchy spojené s príjmom vitamínov bežné v rozvojových, ale aj rozvinutých krajinách. Na začiatku 21. storočia sú tieto deficiencie zvyčajne sporadické, hoci bol zaznamenaný mierny nedostatok vitamínu A v rozvojových krajinách. Existujú taktiež dôkazy o rozšírených subklinických deficienciách vitamínov B1, B2 a B6. Podľa odhadov

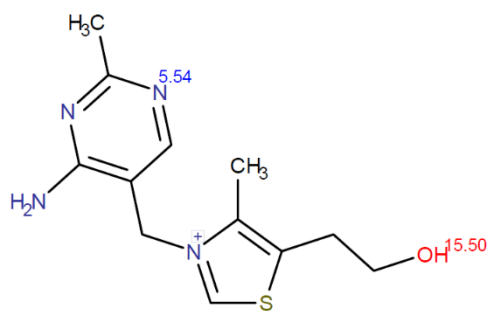
Organizácie Spojených národov z roku 2001, je približne 20 miliónov ľudí ohrozených nedostatkom viacerých foriem vitamínov B. Pravdepodobným dôvodom nedostatočných hladín B vitamínov označili cereálne potraviny, ako pečivo a cestoviny nefortifikované mikronutrientami a pozvoľný pokles hladín viacerých vitamínov v nich.

### 3.1.1 Vitamín B1

Medzi prvé objavené a popísané vitamíny patrí vitamín B1 tiamín. V minulosti bol taktiež nazývaný ako kyselina aberová, oryzanin, alebo aneurin, kvôli schopnosti liečiť polyneuritídu. Podobne ako ostatné vitamíny skupiny B, aj tiamín je významným prekursorom dôležitého koenzýmu tiamín difosfátu a uplatňuje sa aj v ďalších metabolických procesoch, pomocou jeho biologicky aktívnych vitamérov.

#### 3.1.1.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti tiamínu a jeho vitamérov

Th sa skladá z 2-methyl-4-amino-pyridínového kruhu spojeného cez metylénový mostík s 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolovým kruhom (Obrázok 1). Jedná sa o relatívne hydrofilnú molekulu s veľmi vysokou rozpustnosťou vo vode (Tabuľka 1). Literárne zdroje udávajú, že 1 g tiamín hydrochloridu je možné rozpustiť už v 1 ml vody. Na druhej strane, jeho rozpustnosť v alkoholoch ako etanol a metanol je značne nižšia. Je jedným z najmenej stabilných vo vode rozpustných vitamínov. Najvyššiu stabilitu vykazuje v rozmedzí hodnôt pH od 2 do 4. Dokonca aj pri kyslých podmienkach dochádza k jeho degradácii, či už teplom, alebo svetlom (Obrázok 2).



**Tabuľka 1** Fyzikálno-chemické vlastnosti tiamínu

pH	Náboj	logD
1,7	2,00	-4,87
4,6	1,90	-4,02
6,5	1,10	-3,14
7,4	1,01	-3,10
8,0	1,00	-3,10

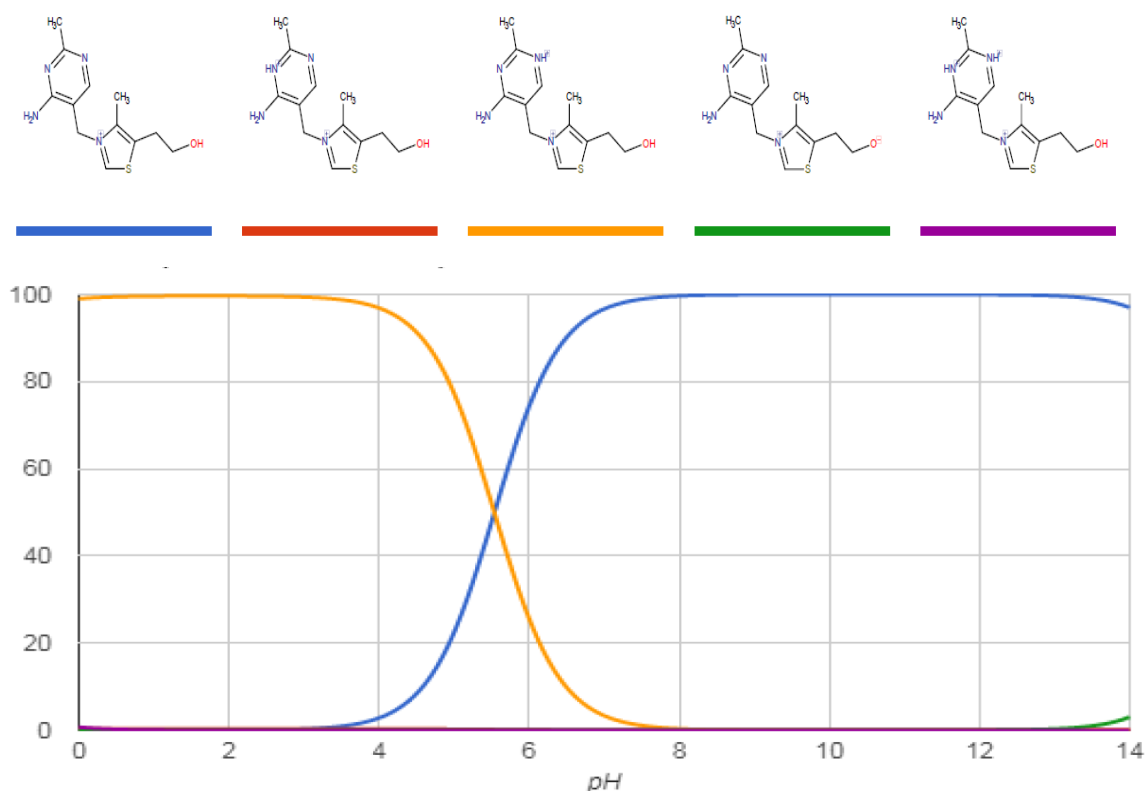
**Obrázok 1** Štruktúra tiamínu

Najviac je známa jeho kofaktorová úloha v metabolických procesoch po esterifikácii jeho postranného hydroxylethylového reťazca na thiazolovom kruhu s naviazaním mono-, di-, alebo tri- fosfátového zvyšku.

Jeho vlastnosti vyplývajú práve z thiazolovej skupiny. Tento heterocyklus je totiž v biologických molekulách relatívne zriedkavý. Výnimkou sú akurát fúzne produkty s benzénom v benzéntiazoloch, ako luciferín. Dôležitým miestom v thiazolovom kruhu je uhlík C-2, ktorý po deprotonácii tvorí karbanión. Alkylácia dusíka N-3 na heterocykle zvyšuje kyslý charakter C-2 uhlíka, ktorý sa chová ako silný nukleofil. Aj napriek tomu je katalýza voľného tiamínu nízka. Dokonca ani pri relatívne silnom zásaditom prostredí nie je možné vo vodných roztokoch tento karbanión sledovať, pretože odhadované  $pK_a$  protónu C-2 je príliš vysoké (v rozsahu 14-20). Relatívnu labilitu je možné sledovať pri výmene za deutérium, preto je to aj častým miestom značenia tejto molekuly.

Sulfidy sú schopné štiepiť Th v mieste metylénového mostíka na dva heterocykly. Práve sulfity sa široko používajú v potravinárskom priemysle ako konzervant a sú zodpovedné za pomalé ubúdanie Th počas skladovania. Taktiež, v mieste metylénového mostíka dochádza k rozkladu v prítomnosti ultrafialového žiarenia a varu. Pri vysokých teplotách sa podieľa na reakciách Maillardovho typu.

Pyridínový heterocyklus je chemicky viac inertný. Pri nízkom pH je dusík N-1 pyrimidínového cyklu protónovaný, zatiaľ čo N-3 dusík je protónovaný iba za extrémnych podmienok. Zohráva však dôležitú úlohu v polohovaní TP na aktívne miesto apoenzýmov.

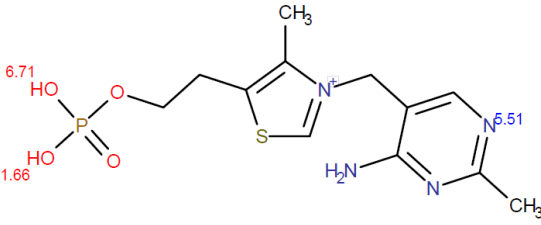


**Obrázok 2** Percentuálna distribúcia mikrodruhov tiamínu v rozdielnom pH

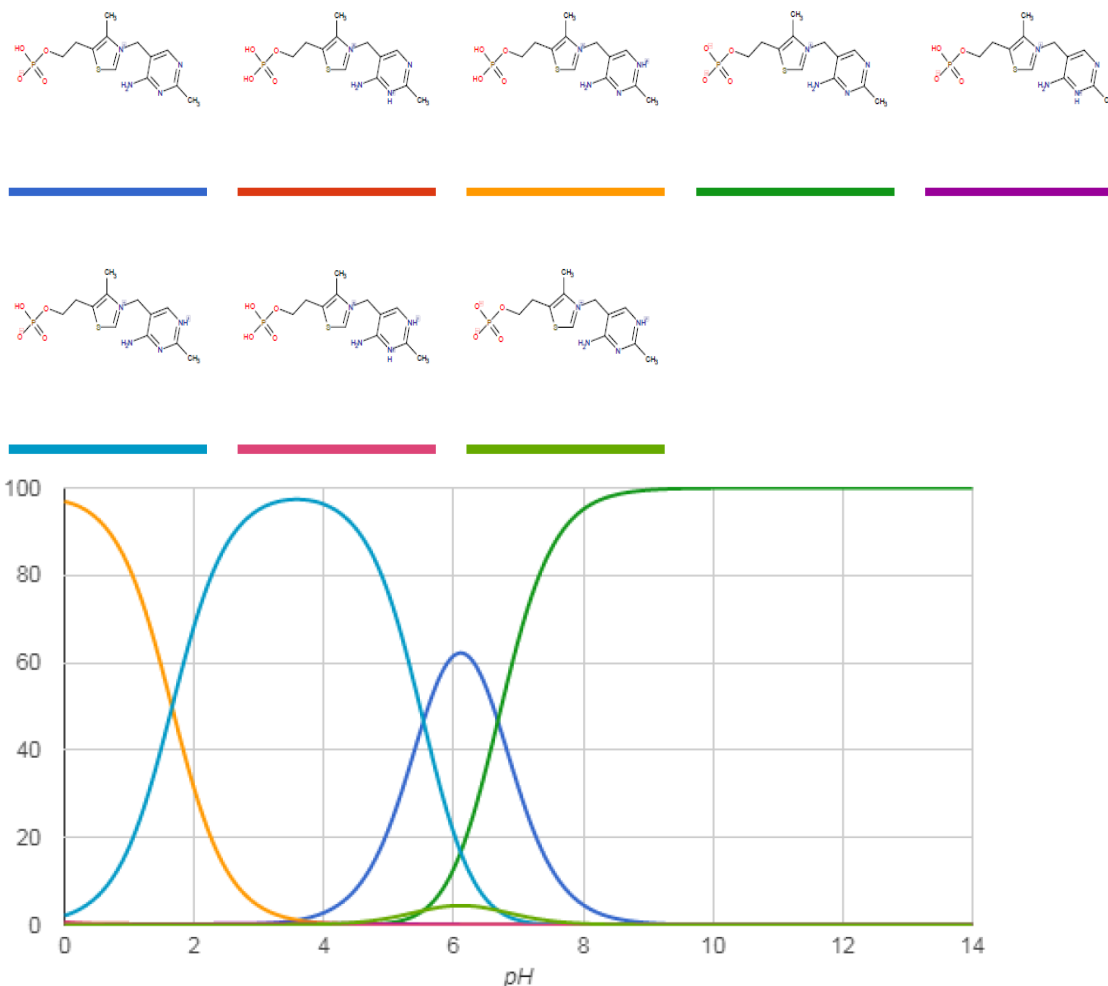


Zatiaľ čo TMP (Obrázok 3, Tabuľka 2) je klasický fosfoester, u TDP (Obrázok 5, Tabuľka 3) a tiamín trifosfátu sa jedná o fosfoanhydridy. Sú to energeticky veľmi bohaté látky a podobne ako nukleosid di- a trifosfáty majú vysoký potenciál pre prenos fosfátovej skupiny (Obrázok 4, Obrázok 6).

**Tabuľka 2** Fyzikálno-chemické vlastnosti TMP

	pH	Náboj	logD
	1,7	1,48	-5,28
	4,6	0,87	-5,28
	6,5	-0,48	-4,62
	7,4	-0,90	-5,14
	8,0	-0,97	-5,65

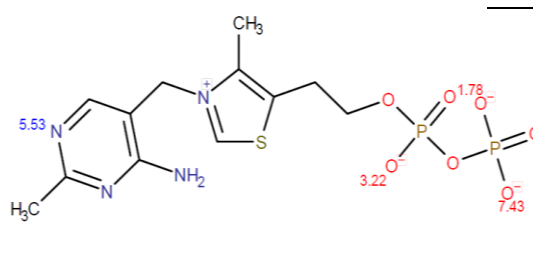
**Obrázok 3** Štruktúra tiamín monofosfátu



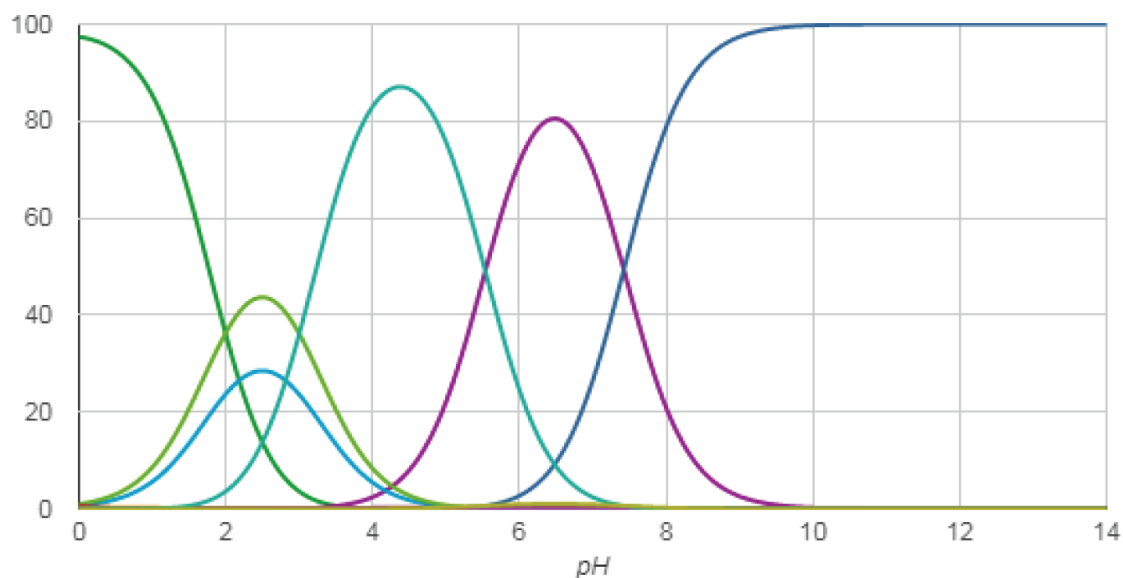
**Obrázok 4** Percentuálna distribúcia mikroduhov tiamín monofosfátu v rozdielnom pH

Obe vitaméry tiamínu vykazujú biologickú aktivitu, zatiaľ čo u tiamín trifosfátu ešte nie je biologická funkcia úplne objasnená. Prítomnosť fosfátových skupín nemá žiaden priamy efekt na katalytické vlastnosti heterocyklov.

**Tabuľka 3** Fyzikálno-chemické vlastnosti TDP

	pH	Náboj	logD
	1,7	1,48	-5,65
	4,6	-0,09	-6,84
	6,5	-1,10	-6,95
	7,4	-1,64	-7,19
	8,0	-1,88	-7,57

**Obrázok 5** Štruktúra tiamín difosfátu



**Obrázok 6** Percentuálna distribúcia mikroduhov tiamín difosfátu v rozdielnom pH

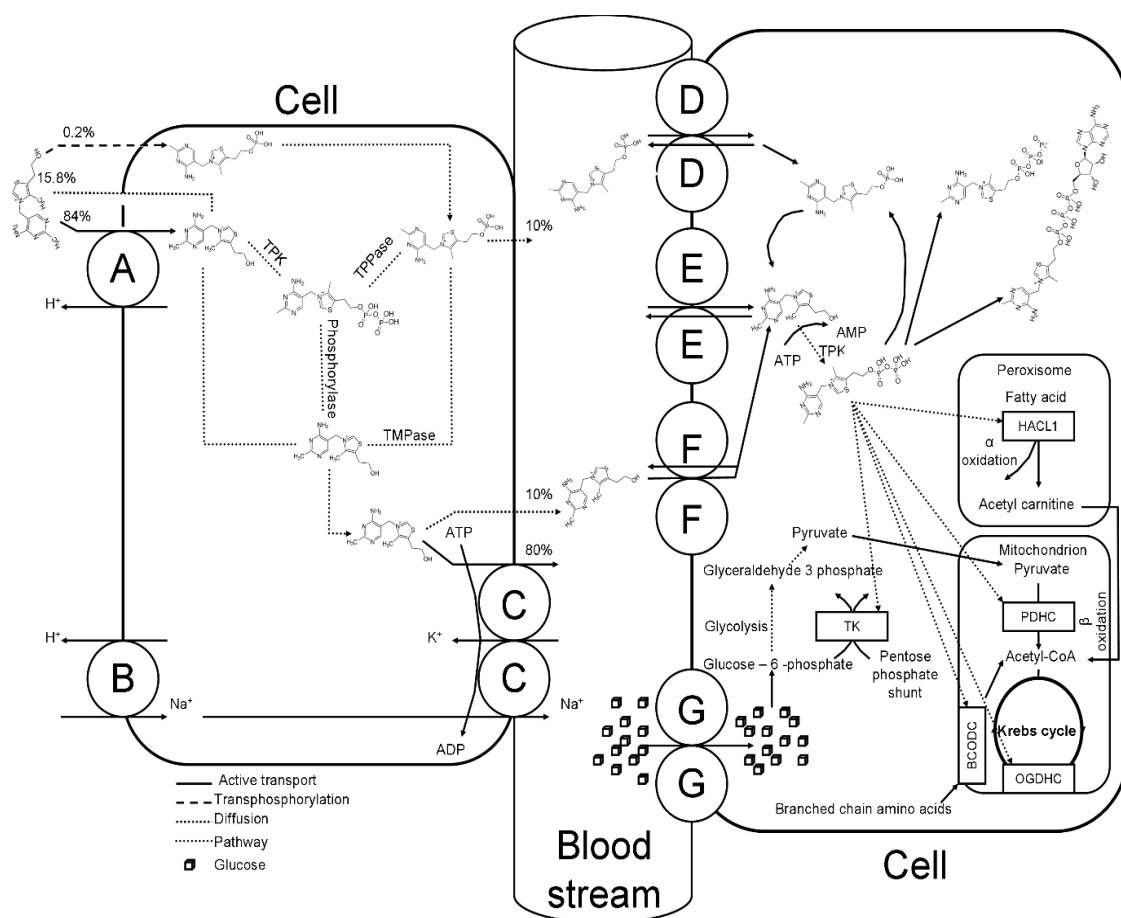
### 3.1.1.2 Biochemické vlastnosti vitamérov tiamínu

Aj napriek tomu, že baktérie, rastliny, huby a kvasinky sú schopné syntetizovať tiamín de novo cez komplexné metabolické dráhy, ľudské telo nie je schopné tiamín syntetizovať. Jeho množstvo sa odvíja od nutričného príjmu v strave a tekutinách. Po požití potravy dochádza k celkovej konverzii vitamínu B1 na voľný tiamín, ktorý je následne vstrebávaný zažívacím systémom. Vstrebávanie sa môže odohrávať buď aktívnym transportom, alebo v prípade nasýtenia prenášačov, taktiež pasívnym transportom pomocou difúzie [1]. V krvnom riečisku dochádza k tvorbe komplexov u esterifikovaných foriem, ale aj u voľného vitamínu, čím sa zvyšuje ich stabilita. Najčastejším krvným prenášačom je albumín [2]. TDP je najrozšírenejšou biologicky aktívnou formou v organizme a tvorí približne 80% celkového obsahu vitamínu B1. Jeho najväčšiu koncentráciu je možné nájsť v eryocytoch a leukocytoch, zatiaľ čo v plazme sa prevažne nachádza vo voľnej forme a vo forme monofosfátového esteru.

Okrem fosforylovaných foriem sa vitamín B1 vyskytuje a v adenylovanej forme, a to ako adenosín tiamín trifosfát, a adenosín tiamín difosfát. Ich špecifická funkcia, vzhľadom na ich relatívne nedávne objavenie zatiaľ, bohužiaľ, nie je ešte dostatočne objasnená.

Po nasýtení tiamínového poolu v organizme je možné prebytočný vitamín B, spolu s jeho degradačnými produktmi, nájsť i v moči [3]. Najčastejšie sa jedná o 2-metyl-4-amino-5-pyrimidín karboxylovú kyselinu a 4-metyl-thiazol-5-octovú kyselinu. Transport vitamínu B1 do centrálnej nervovej sústavy prebieha relatívne pomaly. Aj napriek vysokým koncentráciám cirkulujúceho vitamínu v krvi, je čistý nárast v mozgovom miešnom moku a mozgovom tkanive len nepatrný. Z tohto dôvodu bolo vyvinutých niekoľko derivátov s vyššou biologickou aktivitou. Medzi hlavné deriváty patrí tiamín alyldisulfid, známy pod generickým označením allitiamín a ďalšie syntetické deriváty ako sulbutiamín (o-izobutyryltiamín disulfid) a fursultiamín (tiamín tetrahydrofuryl disulfid). Tieto formy majú lipofilný charakter a sú schopné jednoduchšieho prechodu cez hematoencefalickú bariéru. Ďalším syntetickým derivátom Th, ktorý sa s úspechom používa pri prevencii komplikácií spojených s diabetom mellitus, je generikum benfotiamín (S-benzoyltiamín monofosfát). Nedávne výskumy dokázali zlepšovanie kognitívnych funkcií a dramatický pokles amyloidných plakov a neurofibrilárnych klobiek pri Alzheimerovej chorobe [4]. Benfotiamín je thioester a prítomnosť fosfátovej skupiny zvyšuje jeho hydrofilitu.

Všetky formy vitamínu B1 sú dôležitými prekursori, zapojenými do energetického metabolizmu buniek a správnej neuromuskulárnej funkcie organizmu. Existujú dôkazy, že sa tiamín trifosfát podieľa na regulácii iónových kanálov v nervovom systéme [5]. Voľný vitamín B1 a TMP napomáhajú pri sprostredkovaní parasympatickej aktivity, ktorá napomáha prenášať nervové vzruchy [6, 7]. TDP sa zúčastňuje na katabolických procesoch Krebsovoho cyklu pomocou troch hlavných enzýmových komplexov: transketolázy, pyruvát dehydrogenázy a 2-oxoglutarát dehydrogenázy [8, 9] (Obrázok 7).



**Obrázok 7** Metabolizmus a distribučná dráha tiamínu v organizme prevzaté z [27]

**Legenda:** A – Tiamín/ $H^+$  antiport; B –  $Na^+/H^+$  antiport; C –  $Na^+/K^+$  ATPáza; D – RFC1 redukovaný folátový prenášač; E – THTR1 tiamínový transportér 1; F – THTR2 tiamínový transportér 2; G – GLUT glukozový uniportér; TPK – tiamín pyrofosfokináza; TPPase – tiamín difosfatáza; TMPase – tiamín monofosfatáza; ATP – adenosín trifosfát; ADP – adenosín difosfát; AMP – adenosín monofosfát; HACL1 – 2-hydroxyacyl-koenzým A-lyáza 1; PDHC – pyruvát dehydrogenázový komplex; TK – transketoláza; BCODC – rozvetvený reťazec 2-oxo kyslého dehydrogenázového komplexu; OGDHC – oxoglutarát dehydrogenázový komplex

Pri nedostatočnom príjme vitamínu B1 v potrave, nadmernom príjme jedla s vysokým obsahom tiamináz, alebo pri niektorých patofyziologických procesoch

v organizme, môže dochádzať k redukcii zásob vitamínu B1 a tiamínovej deficiencii už v priebehu zhruba dvoch týždňov [10]. Vitamínová deficiencia vyúsťuje v celú škálu zdravotných komplikácií. Hlavnou príčinou zmien je oslabenie metabolických funkcií buniek a oxidatívny stres, ktorý sa môže prejavovať ako polyneurotické ochorenie známe ako beriberi [11]. Prejavy ochorenia sú v počiatočných štádiách relatívne nešpecifické. Preto dochádza k záchytu a diagnóze tohto ochorenia zväčša v neskorých štádiách. Najčastejšími príčinami zníženia celkových hladín vitamínu B1 bývajú pritom relatívne časté zdravotné komplikácie, alkoholizmus [12], diabetes mellitus [13], interakcie s antibiotickou terapiou [14], nezdravá a nevyvážená strava [15], a generalizovaný zápalový proces [16], ale taktiež zvýšená spotreba vitamínu B1 pri niektorých druhoch nádorových ochorení [17].

**Tabuľka 4** Biochemické vlastnosti vitamérov tiamínu

Analyt	TDP	TMP	Th
Úloha v organizme	Biologicky aktívna forma	Prechodný metabolit	Transportná forma
Prítomnosť	erytrocyty, leukocyty, plazma	plazma, CSF, materské mlieko	plazma, sérum, materské mlieko, moč
Informácia o stave	Biologická dostupnosť	Metabolická využitelnosť	Nutričný príjem
Referenčné hodnoty	70 – 278 nmol/l*  60 - 229 nmol/l**  42 – 176 nmol/l***	1,6 – 6,5 nmol/l*  4 - 60 nmol/l**  0 - 4 nmol/l***	3,3 – 12,4 nmol/l*  2 – 18 nmol/l**  12 – 45 nmol/l***

V plnej krvi – Ref: \* Lu, J., Frank, L., Clin Chem, 2008, 54: 901-906    \*\* Ihara 2005, J.Anal. Bio. Sci., 241-246    \*\*\*Talwar, Clin. Chem., 2000, 704-710

### 3.1.2 Vitamín B6

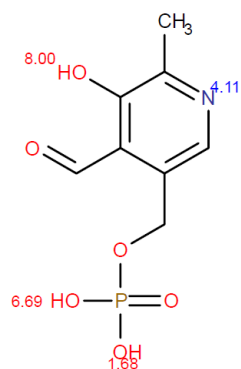
Vitamín B6 je ďalším významným, vo vode rozpustným vitamínom. Vzhľadom na jeho rozmanité chemické vlastnosti a početné fyziologické funkcie v metabolizme, má multimodálny charakter. Podobne ako u predchádzajúceho vitamínu B1, aj vitamín B6

má niekoľko vitamérov. Jedná sa o piridoxín, priridoxal, piridoxamín a ich fosfátové estery piridoxín-5-fosfát, priridoxal-5-fosfát a pyridoxamín-5-fosfát. Najvyššiu biologickú aktivitu vykazuje práve pyridoxal-5-fosfát (P-5-P). Všetky tieto látky sú inkorporované vo viac ako 140 enzýmoch a enzýmových komplexoch naprieč organizmom [18]. Vzhľadom na ich chemickú diverzitu a rozdielne metabolické funkcie, sa ďalej budeme zaoberať najaktívnejším z nich.

### **3.1.2.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti pyridoxal-5-fosfátu**

Pyridoxal-5-fosfát vzniká fosforyláciou 5-hydroxymetylovej skupiny pyridoxalu, za vzniku [(4-formyl-5hydroxy-6-metylpyridín-3-yl)metoxy] fosforečnej kyseliny (Obrázok 8, Tabuľka 5). Podobne ako tiamín, aj u P-5-P bolo historicky zavedených niekoľko mien, ako hiaroxal, sechvitan, vitahexín-P a rada ďalších. Za normálnych laboratórnych podmienok vytvára biele, až mliečne sfarbené kryštály. Je ľahko rozpustný vo vode, ale má minimálnu rozpustnosť v organických rozpúšťadlách. Jeho stabilita je relatívne malá. Stabilita je podmienená pH prostredím, v ktorom sa nachádza (Obrázok 9). Zatiaľ čo v kyslom prostredí je relatívne teplotne stabilný, v zásaditom prostredí sa veľmi rýchlo tepelne rozkladá. Odhaduje sa, že straty vitamínu B6 počas varenia, sú približne 45% u mäsa a 20-30% u zeleniny. V prostredí bohatom na cysteín, dochádza k jeho transformácii, na neaktívny thiazolidínový derivát. Dusík v heterocykle vyvíja silný odkláňajúci efekt na elektróny aldimínu, čo oslabuje všetky tri väzby na  $\alpha$ -uhlík substrátu.

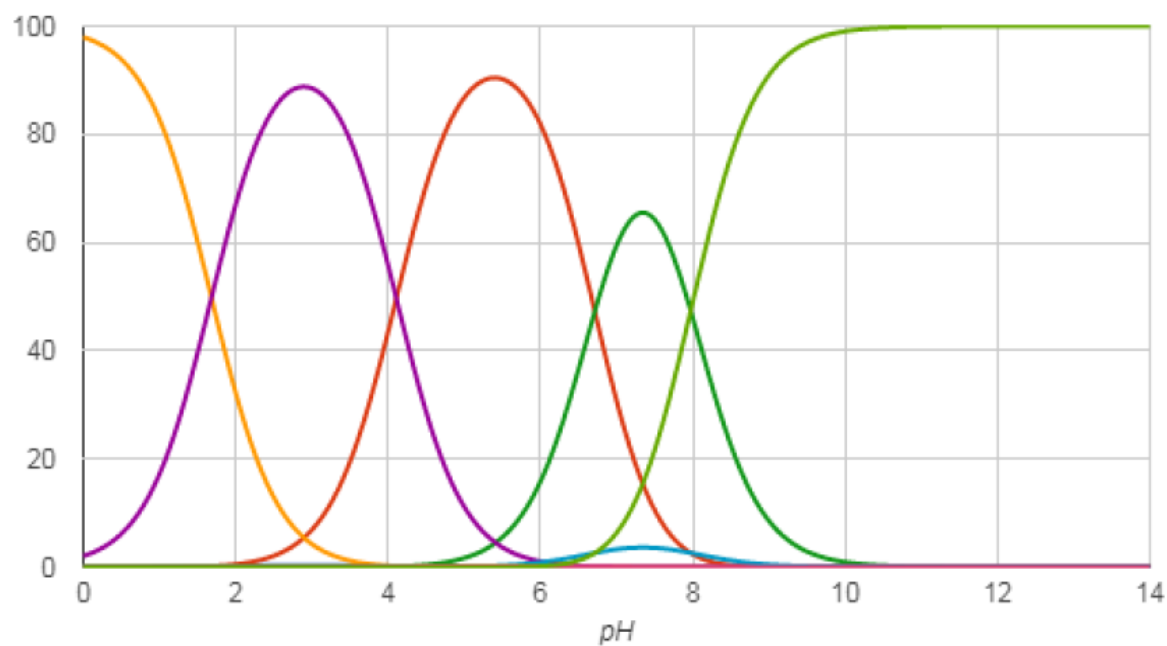
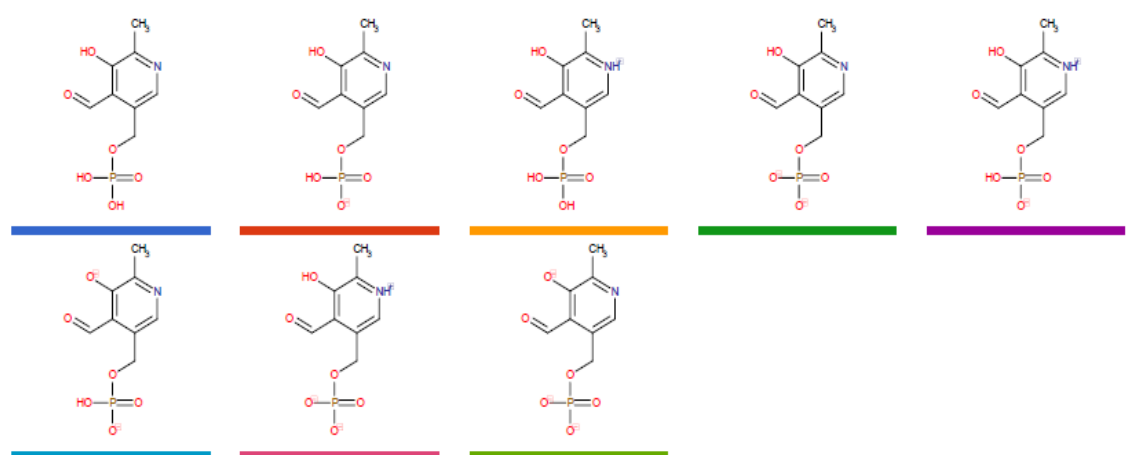
Z dôvodu nízkej stability a vysokej reaktivity s okolitými chemickými zlúčeninami, nielen u fosforylovaných foriem, sa preto na fortifikáciu stravy používa najstabilnejšia forma pyridoxal.



**Tabuľka 5** Fyzikálno-chemické vlastnosti P-5-P

pH	Náboj	logD
1,7	0,48	-1,64
4,6	-0,77	-2,28
6,5	-1,59	-2,54
7,4	-2,12	-3,18
8,0	-2,49	-3,90

**Obrázok 8** Štruktúra pyridoxal-5-fosfátu



**Obrázok 9** Percentuálna distribúcia mikroduhov pyridoxal-5-fosfátu v rozdielnom pH

### 3.1.2.2 Biochemické a metabolické vlastnosti pyridoxal-5-fosfátu

V ľudskom organizme vykazujú všetky formy vitamínu B6 rovnakú biologickú dostupnosť. In vivo dochádza k ich interkonverzii na pyridoxal. Pomocou jedného kinázového enzýmu, je možné všetky previesť na fosforylovanú formu, za prítomnosti zinku. Ľudské bunky síce dokážu syntetizovať P-5-P z jeho vitamérov, cez metabolické dráhy, avšak syntéza de novo nie je možná, preto je organizmus výhradne závislý na jeho dopĺňaní z potravinových zdrojov.

V metabolizme sa zúčastňuje chemických reakcií, kvôli jeho schopnosti tvoriť stabilné adukty Schiffových zásad s amino skupinami. Chová sa ako efektívny lapač elektrónov, čím napomáha k stabilizácii reakčných medziproduktov. Enzýmy s inkorporovaným P-5-P patria do niekoľkých enzymatických tried:

- transferázy,
- hydrolázy,
- lyázy,
- izomerázy,
- oxidoreduktázy.

Viac ako polovica z nich je priamo zapojená do dôležitých krokov v metabolizme aminokyselín, pri dekarboxylácii,  $\alpha,\beta$ -eliminačných reakciách, racemizácii a transaminácii. Počas reakcie tvorí karbonylová skupina koenzýmu Schiffovu zásadu s amino skupinou substrátu, čím naruší väzby v okolí  $\alpha$ -uhlíka, nasledované dekarboxyláciou na amín a celá škála reakcií postrannej aminokyseliny. Vitamín B6 má kľúčovú úlohu v uhlíkovom metabolizme, ktorý zahŕňa syntézu a metyláciu DNA, čím môže modulovať génovú expresiu. Nemenej dôležitá je aj antioxidačná aktivita, ktorá dokáže potláčať homocysteínom indukovanú aterosklerózu. Adekvátne koncentrácie P-5-P sú dôležité pri prevencii kardiovaskulárnych chorôb [19]. Až 80% vitamínu B6 vo forme P-5-P sa nachádza vo svalových tkanivách. Väčšina z tohto množstva je spojená s glykogén fosforylázou. Pri nedostatku však nedochádza k jeho uvoľňovaniu. Nedochádza k jeho redistribúcii, ale je katabolizovaný a jeho odpadné produkty sú vylúčené v moči. V metabolizme tukov slúži ako koenzým na dekarboxyláciu fosfatidylserínu, za vzniku fosfatidyletanolamínu a fosfatidylcholínu. Úloha v metabolizme polynenasýtených mastných kyselín ešte nie je celkom objasnená, ale je známe, že deficiencia P-5-P vyúsťuje v zníženú aktivitu  $\Delta^6$  desaturázy a narušeníu syntézy eicosapentaénovej a docosahexaénovej kyseliny [20, 21].



Fosforylované vitaméry sú po ingescii defosforylované pomocou zásaditej fosfatázy na povrchu membrán buniek v črevnej mukóze. Následne dochádza k ich prestupu pomocou prenášačmi sprostredkovanej difúzie. V intracelulárnom priestore mukotických buniek sa nachádza pyridoxín kináza a pyridoxín fosfát oxidáza, takže dochádza k ich nahromadeniu a k metabolickému záchytu. Väčšina vitamínu B6 je následne uvoľnená do portálneho obehu, vo forme pyridoxalu, po defosforylácii na povrchu serózy. Tkanivový príjem je taktiež sprostredkovaný prenášačmi pyridoxalu a v cytosole je okamžite konvertovaný na fosforylovanú formu. Voľne cirkulujúce formy sú hydrolyzované zásaditou fosfatázou. Všetky tkanivá vykazujú kinázovú aktivitu k pyridoxínu, avšak fosfát oxidázová aktivita bola nájdená prevažne v pečeni, obličkách a mozgu. Aktivita oxidázy je spätne inhibične regulovaná množstvom P-5-P. Biologicky aktívny P-5-P neprechádza bunkovými membránami, za fyziologických podmienok sa v plazme nachádza iba ako voľný pyridoxal. Voľná forma je oxidovaná na kyselinu 4-pyridoxovú pomocou aldehyd oxidázy. Táto kyselina je aktívne sekretovaná cez glomeruly a spätne vychytávaná renálnymi tubulmi z moču. Pomer medzi plazmatickou koncentráciou 4-pyridoxovej kyseliny a koncentráciou v moči sa preto používa ako index renálnych funkcií [22].

Deficiencie P-5-P sa najčastejšie prejavujú u podvýživných ľudí a u pacientov s gastrointestinálnymi záškrobmi. Dochádza u nich k marginálnej nedostatocnosti, ktorá vplýva na metabolizmus aminokyselín, a tiež na schopnosť reakcie steroidných hormónov [23]. Taktiež vysoké dávky, v rádovo 100 násobných množstvách, majú negatívny vplyv na zdravotný stav a prezentujú sa neuropatologickými symptómami, v podobe periférnej senzorickej neuropatie [18].

### **3.1.3 Analýza vitamínov B1 a B6 pomocou kvapalinovej chromatografie**

Diagnostika vitamínového statusu, v súvislosti s personalizovanou terapiou, sa v súčasnej dobe stáva súčasťou štandardných operačných procedúr klinických laboratórií. Stanovovanie vitamínov a ich vitamérov je včleňované do klinických smerníc po celom svete a je postupne harmonizované v programoch zaistovania kvality (Národné autorizačné stredisko pre klinické laboratória, Český inštitút pre akreditáciu o.p.s., SEKK, alebo v zahraničí DGKL v Nemecku, alebo UK NEQAS vo Veľkej Británii). Vďaka štandardizácii laboratórnych postupov a vývoju laboratórnych kitov na chromatografickú analýzu sa počet používaných metodík pomaly zvyšuje [24, 25].

Navzdory tomu sa stanovovanie tiamínu, spolu s jeho biologicky aktívnymi fosforylovanými formami, a pyridoxal-5-fosfátu v súbežnej analýze rutinne nevykonáva. Ich analýza je náročná kvôli ich nestabilite, reaktivite, rozdielnym fyzikálnym a chemickým vlastnostiam, ale hlavne kvôli zloženiu biologickej matrice, v ktorej sa nachádzajú [26]. Z toho dôvodu sa na ich chromatografickú separáciu v reverznom móde najčastejšie používajú iónovo-párové činidlá. Separácia pomocou hydrofilnej interakčnej chromatografie (HILIC) naproti tomu ponúka výhody v lepšej retencii týchto polárnych látok. Mechanizmus HILIC separácie je citlivý na zmeny v ustálených podmienkach na kolóne. Z toho dôvodu je nevyhnutné udržiavať nízke dávkovanie vzorky. To má za následok zníženú detekčnú citlivosť, ktorá aj kvôli nízkym hladinám stanovovaných látok prítomných v krvi, robí rutinnú analýzu vitamínov ťažko aplikovateľnú.

Navyše, použitie vhodného detekčného systému má zásadný význam pri analýze týchto vitamínov. Použitie spektrofotometrickej detekcie v UV/VIS oblasti je kvôli ich nízkej absorbancii v cieľových hladinách pokrývajúcich fyziologické a patologické koncentračné rozmedzie prakticky nedostačujúce. Z toho dôvodu sa na ich detekciu najčastejšie využíva fluorescenčná detekcia po derivatizačnej reakcii, buď v off-line usporiadaní pred kolónou, alebo on-line po kolónovej separácii [27-29]. Ďalšou úspešne využívanou detekčnou technikou, s nízkym limitom detekcie, je hmotnostná spektrometria (kapitola 3.1.4.6). Tá však nemusí byť vždy kompatibilná s podmienkami používanými pri ich analýze a niekoľkonásobne zvyšuje cenu analýzy.

### **3.1.4 Metódy na stanovenie vitamínu B1**

Na analýzu statusu vitamínu B1, ale i jeho vitamérov, bolo vyvinutých niekoľko metód, ktoré sú úspešne zavedené do klinickej praxe. Sú založené na metabolizácii alebo na enzymatickej reakcii, pričom vitamín slúži ako regulátor tejto reakcie. Z týchto techník stanovovania sa najčastejšie používajú mikrobiologické a enzymatické metódy. Zlatým štandardom metodologických postupov analýzy Th, pred rozvojom chromatografických techník, bol B1 saturačný test, známy aj ako transketolázový test. Princípom tejto nepriamej metódy je stanovenie transketolázovej aktivity, ktorá silne koreluje s množstvom TDP prítomného vo vzorke [30, 31]. Pri analýze však existuje množstvo interferujúcich faktorov, ktoré v konečnom dôsledku môžu viesť k falošne pozitívnym alebo negatívnym výsledkom reakcie [32].

Ďalšou, rutinne používanou metodikou, je mikrobiologické stanovovanie koncentrácie vitamínu B1, po enzymatickej hydrolýze vitamérov na voľnú formu. Táto

metodika vyžaduje časovo náročnú kultiváciu, precíznosť v úprave a dodržiavaní podmienok a správne podmienky pri reprodukcii výsledkov [33]. Obe tieto metódy sú však pre jeden vitamín, vyžadujú si časovo náročnú úpravu vzoriek, majú limitácie v selektivite a sú náchylné k chybám v úprave a kontaminácii analyzovaných vzoriek. Sú taktiež relatívne finančne náročné, ak sa používajú na malom počte vzoriek. Preto k rýchlemu monitorovaniu vitamínového stavu pacientov, postupne dochádza k prechodu na citlivejšie, menej náročné a vysoko účinné separačné metódy, ako HPLC a UHPLC a CE [34].

V poslednom desaťročí došlo k vývoju celej škály separačných metód a postupov úpravy biologického materiálu, ktoré viedli k zníženiu interferencií a pomohli znížiť detekčné limity cieľových látok. Zvolenie vhodných separačných podmienok má veľký význam na zaistenie presnosti, správnosti a citlivosti analýzy a prítomnosť nežiadúcich komponentov matrice [35-37].

Chromatografické techniky majú veľkú výhodu pri separácii interferujúcich látok od cieľových zlúčenín a sú schopné, na rozdiel od enzymatických a mikrobiologických testov, rozlíšiť medzi niekoľkými formami vitamérov. V závislosti na približnej koncentrácii Th vo vzorke, ktorá sa má analyzovať, je možné vzorky po príprave detegovať pomocou UV, elektrochemických detektorov a hmotnostnej spektrometrie.

Po derivatizácii je možné použiť aj fluorescenčnú detekciu, ktorá značne zvýši citlivosť analýzy [38]. Stanovenie Th je spojené s potrebou relatívne nízkeho pH mobilnej fázy a samotného extraktu, aby došlo k stabilizácii a minimalizácii degradácie fosforylovaných foriem [39]. Po derivatizácii na deriváty tiochrómu, sú tieto produkty stabilné nad pH 8, kde vykazujú aj najvyššiu mieru fluorescencie. Tieto podmienky však skracujú životnosť kolóny, v dôsledku nadmerného opotrebovania a vedú k tzv. „krvácaniu kolóny“ a strate citlivosti. Za posledných desať rokov bolo navrhnutých niekoľko metód na stanovenie Th a jeho esterov pomocou HPLC a UHPLC s predkolónovou, alebo postkolónovou derivatizáciou, spojenou s fluorescenčnou detekciou [35, 40, 41]. Trendy sa v súčasnosti prikláňajú k hmotnostnej spektrometrii, ktorá si nevyžaduje derivatizáciu a je citlivejšia.

#### **3.1.4.1 Chromatografia na normálnej fáze**

Chromatografická separácia, založená na polárnom sorbente a nepolárnej mobilnej fáze, bola v minulosti často využívanou technikou k analýze vitamínov. V priebehu rokov bolo predstavených niekoľko metód vhodných k analýze vitamínového

stavu [42, 43]. Mali podobné nevýhody, ako zdĺhavá príprava vzoriek, veľký objem potrebného biologického materiálu a použitie veľkého množstva škodlivých organických rozpúšťadiel v mobilnej fáze. Napriek tomu ale mali výrazne nižšie detekčné limity, ako niektoré z modernejších spôsobov separácie, ktoré tiež využívali fluorescenčnú detekciu.

Najrozšírenejšou stacionárnou fázou použitou na tieto analýzy, bol silikagél s naviazanou amino- skupinou. Najčastejšie sa jednalo o modifikáciu silikagélu aminopropylovou funkčnou skupinou. Detekcia následne prebiehala po predkolónovej derivatizácii, pomocou fluorescenčného detektora [18, 44-46]. Vo väčšine prípadov sa však jednalo o analýzu celkového obsahu Th po enzymatickej hydrolýze fosfoesterov, ktorá bola časovo veľmi náročná. Všetky tieto nevýhody, spolu s predstavením chromatografie na reverznej fáze a HILIC viedli k tomu, že chromatografia v normálnej fáze pri analýze vitamínov rozpustných vo vode, bola nahradená modernejšími a inovatívnymi technikami.

#### **3.1.4.2 Chromatografia pomocou hydrofilných interakcií (HILIC)**

Kvapalinová chromatografia, s použitím stacionárnych fáz HILIC, je výhodná technika analýzy polárnych molekúl. Analyty s vysokou polaritou, majú zvyčajne nízku retenciu na kolónach s reverzným usporiadaním, čo môže viesť k interferencii s komponentmi matrice a rozmývaniu jednotlivých zón. Mnohé z komponentov mobilnej fázy, rutinne používaných v reverznom režime (pufry, iónovo-párové činidlá, atď.), navyše neumožňujú použitie hmotnostnej detekcie. Pri polárnej stacionárnej fáze, v normálnom usporiadaní, je retencia polárnych látok vysoká a použité nepolárne organické rozpúšťadlá v mobilnej fáze môžu inhibovať produkty derivatizácie. Zloženie mobilnej fázy v režime HILIC kombinuje výhody oboch prístupov, pričom minimalizuje ich nežiadúce účinky. Je vhodný aj na detekciu hmotnostnou spektrometriou, kvôli relatívne vysokému obsahu organických rozpúšťadiel v mobilnej fáze a zvýšenej citlivosti detekčného systému[47].

Aj napriek viacerým publikovaným metódam prezentujúcim využitie chromatografickej separácie, pomocou hydrofilných interakcií k analýze štandardov vitamínov vrátane Th [48-55] ku dnešnému dňu, zatiaľ neexistuje publikácia popisujúca simultánnu analýzu Th a jeho derivátov v biologických tekutinách. Bajad a kol. vyvinuli metódu na analýzu bunkových metabolitov v bakteriálnych kultúrach. Okrem klasického reverzného usporiadania využili pri analýze i HILIC, po ktorom nasledovala detekcia na hmotnostnom spektrometri s trojitým kvadrupólom. Analýza 141 metabolitov, vrátane 12

vitamínov a ich derivátov s relatívne malou RSD, poskytla skvelý nástroj nielen na sledovanie bakteriálnych kultúr a ich bunkového metabolizmu, ale aj na sledovanie biologických tekutín [56, 57].

### **3.1.4.3 Chromatografia na reverznej fáze**

Najbežnejšie používaná metóda na stanovenie Th využíva reverznú fázu v spojení s HPLC alebo UHPLC. Th je polárna zlúčenina, retenčné mechanizmy na reverznej fáze sú dobre pozorované a široko využívané. Najčastejšie používané chromatografické podmienky sú založené na reverznej fáze C-18 s priemerom častíc 5 µm a časoch analýzy približne 15-20 minút. Bolo publikovaných niekoľko štúdií využívajúcich metódy založené na HPLC systémoch. Obvyklými mobilnými fázami boli roztoky fosfátového pufru, v rôznych molárnych koncentráciách v rozmedzí od 5 mM do 50 mM, kombinovaných s použitím metanolu alebo acetonitrilu od 2 do 30%, na zlepšenie podmienok elúcie. Popísané UHPLC techniky spojené s hmotnostnou detekciou vyžívajú hlavne pufrý octanu amónneho a vodu s prísadami kompatibilnými s hmotnostnou detekciou. Vďaka relatívne silnej retencii voľného Th, v porovnaní s fosforylovanými formami, majú izokratické podmienky separácie obvykle za následok rozmývanie jeho píku a dlhší čas analýzy. Na stanovenie Th a jeho vitamérov sa preto častejšie používajú gradientové metódy. Široko používané sú taktiež amidové kolóny a kolóny s iónomieničmi. V týchto prípadoch je najčastejšie uvádzaná post-kolónová derivatizácia[1, 56].

Hoad a kol. nedávno publikovali porovnanie metód medzi laboratóriami zapojenými do programu zabezpečenia kvality Royal College of Pathologists of Australia [24]. Väčšina laboratórií, ktoré používali kvapalinovú chromatografiu, využívala k úprave vzorky precipitáciu bielkovín a predkolónovú derivatizáciu pomocou HPLC na reverznej fáze, spojenú s fluorescenčnou detekciou. Napriek tomu, že pre tento test bolo navrhnutých a testovaných veľa vnútorných štandardov v niekoľkých publikáciách, napríklad pyritiamín, acetylneurín, chlóretyltiamín [7, 24, 27] alebo <sup>13</sup>C-tiamín, na detekciu hmotnostnou spektrometriou stále existujú metodiky, ktoré internú štandardizáciu nevyužívajú.

#### **3.1.4.4 Plynová chromatografia**

Plynová chromatografia je užitočná a citlivá analytická metóda, ale nízka prchavosť Th a jeho derivátov a ich polárna povaha, si k ich analýze vyžaduje derivatizáciu a vysoké teploty, ktoré môžu Th rozkladať. Niektoré z metód, využívajúcich plynovú chromatografiu na analýzu analytov súvisiacich s Th, boli stručne preskúmané [8, 58]. Boli vyhodnotené ako nevhodné, kvôli zrejým nevýhodám, ako slabá citlivosť a nepraktickosť pri analýze biologických tekutín. Nevýhodou týchto metód je veľké množstvo požadovanej vzorky, nemožnosť určiť esterifikované formy Th a ich možný rozklad a interferencie v dôsledku použitej predúpravy vzoriek a teploty.

#### **3.1.4.5 Hyphenované separačné techniky**

Zaujímavým prístupom k analýze vo vode rozpustných vitamínov môže byť kombinácia chromatografických techník, ktoré umožňujú dobrú selektivitu s elektroforetickými technikami a používajú malé množstvo vzorky s vysokou separačnou účinnosťou. Wei a kol. použili kapilárnu elektro-chromatografiu, kombinovanú s polymérnou monolitickou kolónou, na analýzu niekoľkých vo vode rozpustných vitamínov v moči pomocou UV detekcie [38]. Jednoduchá príprava vzorky, ktorá pozostáva iba z centrifugácie, kroku filtrácie a času analýzy približne 10 minút, sú kľúčovými faktormi pre zváženie tejto metódy v klinickej praxi. Metóda má rozsah detekcie pre Th v rozmedzí od 0,07 do 8,86  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (207,5  $\text{pmol} / \text{l}$  až 26,27  $\mu\text{mol} / \text{l}$ ), vďaka čomu je dostatočne citlivá na stanovenie koncentrácie Th v biologických tekutinách podľa referenčného rozsahu uvádzaného v niektorých publikáciách [5, 31, 59]. Podobný prístup použili Jia a kol., na meranie 11 vo vode rozpustných vitamínov, vrátane celkového obsahu Th, vysokotlakovou kapilárnou elektro-chromatografiou s monolitickou kolónou ODS vo vzorkách kukurice [41]. Nízka spotreba rozpúšťadiel a schopnosť merať viac analytov počas jedného merania, sú len niektorými výhodami tejto metódy. Na merania sa však použilo sofistikované prístrojové vybavenie, čo by pre niektoré laboratóriá mohlo byť problematické. Boli tiež predstavené metódy využívajúce mikroemulznú elektrokinetickú chromatografiu na stanovenie vitamínu B1 v potravinách [42-44], ale doteraz nebola publikovaná žiadna metóda, ktorá by túto skúšku využívala na biologické vzorky.

#### **3.1.4.6 Hmotnostná spektrometria a budúce trendy v analýze tiamínu**

Hmotnostná spektrometria dnes neodmysliteľne patrí k štandardnému vybaveniu väčšiny laboratórií. Pred rokom 2000 bolo publikovaných iba niekoľko článkov, popisujúcich použitie detekcie hmotnostnou spektrometriou pri analýze Th a niekoľkých ďalších liečiv v tkanivových extraktoch a poľnohospodárskych výrobkoch. S rozvojom citlivosti v hmotnostnej spektrometrii a jej ekonomickou dostupnosťou, však tieto techniky detekcie začali prevládať. Dnes existuje množstvo článkov (približne 1000, podľa webofscience.com a cca 1300, podľa scholar.google.com za roky 2019-2020) popisujúcich metódy stanovenia vitamínu B1, s detekčnými systémami MS v biologických tekutinách a vzorkách tkanív [60-63].

Budúce trendy vo vývoji metód by sa mali zamerať na miniaturizáciu a automatizáciu techník, zvýšiť citlivosť a znížiť spotrebu rozpúšťadiel a vzoriek. Ďalšími dôležitými aspektmi sú: čas na jeden pokus, príprava vzorky a postupy extrakcie.

### 3.2 Metódy úpravy biologického materiálu k chromatografickej analýze

Spôsob úpravy vzorky zohráva kľúčovú úlohu v analytickom procese. Jedná sa o súbor techník, používaných k odstráneniu rušivých zložiek matrice pred analýzou a úprav skúmaného materiálu tak, aby došlo ku koncentrovaniu cielených analytov a ich zlepšenej detekcii. Okrem týchto hlavných charakteristík, sa do úpravy vzoriek zaraďujú rozličné procesy, ktoré zahrňujú aspiráciu, nanášanie, manipulovanie a dispenzáciu kvapalín, uvoľnenie cieľových látok zo zdrojového substrátu pomocou hydrolýzy, riedenie, filtrácia, odparenie, homogenizácia, ultrazvukovanie, zmiešavanie vzoriek a samotné dodávanie vzorky prístrojom.

Najčastejším cieľom úpravy sú:

1. Odstránenie nežiadúcich komponentov matrice, ktoré môžu spôsobovať interferencie pri analýze, čím sa zlepši špecificita metódy.
2. Koncentrácia analytu na zlepšenie limitu detekcie analytickej metódy.
3. Zmena prostredia v ktorom sa analyt nachádza tak, aby bolo vhodné na zavedenie vzorky do chromatografického systému.
4. Selektívne odstránenie látok, ak rozlišovacia schopnosť prístroja nie je dostatočná, na kompletnú separáciu všetkých látok.
5. Nariedenie vzoriek na zníženie sily rozpúšťadiel tak, aby sa zabránilo ich inkompatibilite so zložkami mobilnej fázy.
6. Odstránenie všetkých nežiadúcich zložiek, ktoré by mohli poškodiť prístrojové vybavenie, zablokovat' kapiláry a kolónu.
7. Skvapalnenie látok, aby bolo možné ich zaviesť do chromatografického systému.
8. Stabilizácia látok, aby sa zabránilo ich fyzikálnej, hydrolytickej, alebo enzymatickej degradácii.

Na úpravu vzoriek je možné vybrať niekoľko techník, ktoré sa líšia v spôsobe realizácie, časových nárokoch, možnosti automatizácie, fyzikálne - chemických interakcií s analytmi, koncentračného faktora a selektivity finálneho extraktu. Zvolená metodika závisí od komplexnosti matrice a požiadaviek analýzy.

Iné požiadavky na úpravu sú napríklad kladené na analýzu látok pri vývoji liečiv a iné na ich monitorovanie v biologickom materiály, kde u pacientov dochádza k podávaniu relatívne malých množstiev účinných látok [64].



Medzi základné druhy preparácie vzoriek patria:

- riedenie vzoriek,
- homogenizácia,
- precipitácia proteínov,
- filtrácia,
- centrifugácia,
- odstránenie proteínov pomocou ekvilibračnej dialýzy alebo ultrafiltrácie,
- extrakcia z kvapaliny do kvapaliny,
- extrakcia z pevnej látky do kvapaliny,
- extrakcia z kvapaliny do plynného média,
- turbulentná prietoková chromatografia,
- imunoafinitná extrakcia,
- derivatizácia.

V tejto kapitole budú uvedené základné stratégie a východiskové prístupy k úprave vzoriek v podmienkach, kde je vyžadované rýchle a efektívne prispôsobenie vzorky tak, aby bola vhodná k chromatografickej analýze. Najbežnejšie postupy sú popísané v nasledujúcich kapitolách.

### **3.2.1 Riedenie vzoriek**

Jedným z najjednoduchších prístupov spracovania vzorky je rozriedenie vzoriek rozpúšťadlom. Jedná sa o najrýchlejšiu redukciu interferujúcich látok vzorky, bez nutnosti ich separácie. Riedenie vzoriek napomáha k zníženiu nežiadúcich vplyvov pri následnej chromatografickej analýze, ako napríklad precipitácia proteínov v zariadení, vyzrážanie organických a anorganických solí, matricový efekt, zvýšenie ionizácie analytov a rada ďalších výhod. Uplatniteľnosť tohto prístupu závisí od hladiny cieľových analytov vo vzorke. Ich koncentrácia musí byť dostatočne vysoká na to, aby nedošlo po nariadení k zníženiu ich koncentrácie pod detekčný limit zariadenia [65].

Každá vzorka a v nej obsiahnutý analyt, si môže vyžadovať na úspešnú analýzu iný stupeň nariadenia. Univerzálny faktor riedenia vzorky na odstránenie matricových efektov však neexistuje. Niektoré štúdie používajú až 1000- násobné riedenie. Avšak, pri stanovovaní iných látok môže tak vysoké zriedenie znemožniť ich analýzu.

Riedenie musí spĺňať dve zásadné kritériá:

- nesmie dochádzať k interakciám a degradácii, alebo inému pozmeneniu vzorky,
- nesmie interagovať so zložkami mobilnej fázy.

Najčastejšie sa v bioanalýze jedná o vodné roztoky s malým podielom kyselín, zásad, pufov, alebo solí. Používajú sa aj nenedenaturujúce organické rozpúšťadlá, ktorých úlohou je zníženie povrchového napätia a zníženie viskozity [65, 66].

### 3.2.2 Homogenizácia

Homogenizáciou sa všeobecne označuje proces úpravy vzoriek za účelom ich uniformity v textúre, konzistencii a zložení, pomocou miesenia a drvenia vzorky. Jedná sa o najviac využívanú, a relatívne často opomínanú metodiku úpravy vzoriek, ku kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze organického materiálu k analýze [67].

Počas procesu homogenizácie je vzorka rozdelená na identické časti tak, aby odstránenie časti vzorky nerozrušilo a stále presne odpovedalo molekulárnej kompozícii vzorky. V mnohých prípadoch je homogenizácia používaná aj v prípade hĺbkového miesenia prirodzene sa nemiesiteľných látok. Zmes je v týchto prípadoch zredukovaná na malé uniformné kusy, ktoré je jednoduchšie spracovať.

Základnými úlohami homogenizácie sú:

zjednotenie distribúcie obsahových zložiek zmesí,

redukcia veľkosti častíc,

rozrušenie bunkových stien,

eradikácia patogénov vo vzorke,

tvorba stabilných emulzií a disperzií.

Pri redukcii veľkosti častíc je pomocou homogenizácie možné dosiahnuť vysokú uniformitu rozmeru, ktorá v niektorých prípadoch môže dosiahnuť jednotnosť v rozsahu niekoľkých nanometrov. Obsahové látky sa procesom homogenizácie rovnomerne distribuujú do všetkých častí zmesi, čím vzniká jednotný, reprezentatívny homogenát. Zmenšenie veľkosti častíc umožňuje ich ľahšiu kombináciu, nielen s ďalšími komponentmi vo vzorkách, ale aj s ďalšími prísadami navzájom. Zvyšuje to stabilitu emulzných zmesí a disperzií. To je dôležité najmä u homogenátov, ktoré musia byť konzistentné čo do vzhľadu, chuti, textúry, viskozity, alebo nutričnej hodnoty. Ich

primeranou homogenizáciou je možné predĺžiť ich dátum spotreby, trvanlivosť a zjednotiť kvalitu výrobkov.

V bioanalýze je homogenizácia využívaná aj na lýzu bunkových membrán, vďaka čomu dochádza k uvoľneniu intracelulárnych komponentov a ich rovnomernej distribúcii vo vzorke. Existuje niekoľko prístupov k homogenizácii vzoriek. Každá z nich využíva jeden, alebo kombináciu fyzikálnych síl, za účelom vzniku rovnomernej zmesi. Medzi najčastejšie využívané prístupy patria: mechanická, vysokotlaková a ultrazvuková homogenizácia. Vedľajším účinkom ich aplikácie, je rozdielny stupeň sterility vzorky. Napríklad vysokotlaková homogenizácia dokáže efektívne eradikovať choroboplodné zárodky patogénnych mikroorganizmov a pravidelne sa za týmto účelom využíva v potravinárskom priemysle. Ďalšie druhy homogenizátorov, najmä mechanických, dokážu vyvinúť vysoké teploty počas premiešavania. Dochádza však aj k celkovej degradácii vzorky, čo značne znižuje ich potenciál pri danom využití [68]. Najčastejšie postupy pri mechanickej homogenizácii sú uvedené v Tabuľke 6.

**Tabuľka 6** Vybrané spôsoby homogenizácie vzoriek

---

<b>Miešanie</b>	Miešadlo nasekáva polomäkké látky na menšie časti, čím ju pretvára na konzistentnejšie formy.
<b>Sekanie</b>	Mechanické rozrezanie vzorky na menšie časti.
<b>Drvenie</b>	Drviče s variabilnou čeľusťou z karbidu volfrámu zmenšujú veľké a tvrdé vzorky na priemer 1 - 15 mm.
<b>Rezanie</b>	Rezacie mlyny môžu redukovať mäkké, až stredne tvrdé materiály (s priemerom <100 mm), pomocou rotačných a stacionárnych rezacích nožov - zmenšená veľkosť závisí od sít, používaných v kombinácii s procesom rezania.
<b>Roztieranie</b>	Trecia miska a paličky sú najobľúbenejšie. Mechanické trecie misky štandardizujú mletie až na analytickú jemnosť. Používajú sa na rozmletie za mokra, aj za sucha. Môže sa dosiahnuť jemnosť približne 10 µm.
<b>Macerovanie</b>	Rozmočenie mäkkého materiálu na menšie časti samovoľným trhaním, rozpúšťaním atď.
<b>Mletie</b>	Disky mlynčekov rozomelú tvrdé vzorky, s priemerom <20 mm medzi stacionárnym a rotujúcim diskom, s nastaviteľným nastavením medzery. Všeobecne je možné zmenšiť častice na 100 µm. Automatické rotorové mlynčeky kombinujú rázový moment so strihom pre mäkké až stredne tvrdé a vláknité materiály, s výslednou veľkosťou až do 80 µm. Gul'ové mlynčeky, rozomieľajú materiál na jemnosť do sub-mikrónových veľkostí, pomocou vysokej energie mletia, prostredníctvom odstredivého alebo planétového pôsobenia, s použitím gul'ôčok z achátu, karbidu wolfrámu alebo teflónom pokrytou oceľou.
<b>Lisovanie</b>	Všeobecne sa týka vytlačania kvapaliny z polotuhého materiálu, na účely ďalšej analýzy.
<b>Mrvenie</b>	Elektromechanicky poháňaná tyč alebo vibračná základňa, ktorá sa používa na mechanické rozdelenie častíc na menšie jednotky. Je možné drviť v mokrom, alebo v suchom stave, s možnosťou použitia tekutého dusíku na solidifikáciu tvárných vzoriek.
<b>Preosievanie</b>	Prechod vzorky kovovým alebo plastovým pletivom, s jednotnou plochou prierezu (3 µm – x mm), na oddelenie častíc s rovnakou veľkosťou. Môže sa preosievať za mokra aj za sucha.

---

### 3.2.3 Filtrácia, sedimentácia a centrifugácia

Pred takmer každou analýzou je vhodné, z preventívnych dôvodov, odstránenie častíc, ktoré sa počas úpravy nerozpustili, alebo procesom úpravy nahromadili vo vzorke. Inak by hrozilo ich nahromadenie v prístroji, upchaniu kapilár, injekčných ventilov a vstupných frít, k zníženiu životnosti kolóny a poškodeniu detektorov. Najčastejšími spôsobmi ich odstránenia sú: filtrácia, centrifugácia a sedimentácia.

Na filtráciu je obvykle používaný určitý druh membrány, ktorý pôsobí ako bariéra selektívne zabráňujúca prechodu častíc väčších, než je jej veľkosť pórov. Tieto membrány môžu byť zložené z papiera, polymérov, organických a anorganických látok, ktoré môžu byť na povrch membrány nanesené, alebo sú v podobe jemného prášku umiestnené do filtračného tubusu. Membrány, používané vo farmaceutickej výrobe, sú skoro vždy vyrábané pomocou techniky fázovej inverzie, alebo metódou odliatku do foriem v kontrolovaných vzduchových komorách. Delia sa na základe porozity, retencie, alebo veľkosti pórov. Porozitou je označované percento povrchového pokrytia pórov. Retencia súvisí s veľkosťou pórov použitou na charakterizáciu filtračnej schopnosti a je vyjadrená v  $\mu\text{m}$ . Výber materiálu má taktiež zásadný vplyv na výsledok analýzy. Napríklad, pri biologických testoch, kde sa filtre využívajú na zachytenie a pomnoženie mikroorganizmov je potrebné, aby filtračný materiál umožnili voľný prietok živín a podporoval ich rast, zatiaľ čo u analytických metód je potrebné, aby daný filtračný materiál neinteragoval so stanovovanými látkami. Filtrácia je obvykle vykonávaná za atmosférického tlaku bez pôsobenia okolitých síl, je ju však možné urýchliť pomocou pretlaku, alebo podtlaku [69].

Sedimentácia je najjednoduchšou technikou na odstránenie pevných častíc. Je závislá na gravitačnej sile, ktorá spôsobuje, že sa ťažšie čiastočky začínajú usadzovať ako prvé. Pri tomto postupe sa suspenzia ponechá stáť, až kým nedôjde k usadeniu častíc na dno nádoby, spravidla pri izbovej teplote. Číry roztok, ktorý sa na povrchu utvorí je potom možné odstrániť a podrobiť analýze. Je to však jedna z časovo najnáročnejších techník [70].

Centrifugácia je bežnou technikou, používanou k oddeleniu nerozpustených a tuhých látok v kvapalnom médiu, ako krv, plazma, či moč. Vzorka je obvykle uložená do špeciálnych rotorov, kde za pomoci centrifugačnej sily dochádza k separácii do dvoch oddelených fáz, na základe ich rozdielnej hustoty. Centrifugácia prispieva k radiálnemu

prestupu pevných častíc od smeru rotácie, kde vzniká kompaktný sediment, nad ktorým vzniká centrifugát, označovaný aj ako supernatant [70]. Väčšina laboratórií vlastní obvykle viac ako jeden typ centrifúgy, s rozdielnymi vlastnosťami. Ich základné delenie sa odvíja od veľkosti a typu rotora, rýchlosti rotácie a množstva vzorky [71].

### 3.2.4 Odstránenie a precipitácia proteínov

Aj keď je odstránenie proteínov pomocou precipitácie považované za metódu s nízkou selektivitou, a nie veľmi dostačujúcou schopnosťou prečistiť vzorky, jedná sa o jednu z najviac používaných metód, hlavne v bioanalýze. Je relatívne časovo nenáročná, jednoduchá a dá sa rýchlo optimalizovať, bez potreby špecifického prístrojového vybavenia. Schopnosť zrážania pri precipitácii je založená na rozdielnej rozpustnosti endogénnych bielkovín a cieľovej zlúčeniny v danej sústave. Je preto výhodná pre analyty citlivé na spracovanie, ako napríklad niektoré prírodné zlúčeniny obsahujúce fenolové skupiny. Tie sú obzvlášť senzitívne k svetlu, teplu a zmenám pH prostredia. Pre tieto analyty je výhodná precipitácia proteínov, ako spôsob prevencie degradácie a oxidácie týchto látok. Pridanie zrážacieho činidla do biologických vzoriek spôsobuje denaturáciu bielkovín, takže sa analyty rozpúšťajú v kvapalnej fáze a sú následne oddelené od proteínových agregátov, či už boli predtým naviazané na danú bielkovinu, alebo nie [72].

Vhodným činidlom na zrážanie môžu byť organické rozpúšťadlá (acetonitril, metanol, etanol, alebo acetón a iné), kyseliny (kyselina chloristá, trichlóroctová, alebo kyselina fosforečná atď.), koncentrované soli, alebo aj dodecylsírán sodný. Najčastejšie používané objemové pomery činidla k vzorke bývajú 0,5:1, 1:1, 2:1, 4:1 a 5:1 [73]. Okrem týchto často používaných prístupov, je možné odstrániť bielkoviny aj za použitia fyzikálnych faktorov, ako napríklad ionizačné žiarenie [74], nízka, alebo vysoká teplota [75, 76].

Vo všeobecnosti vedú organické rozpúšťadlá k menšiemu množstvu nežiadúcich reakcií, ktoré môžu zachytiť cieľovú látku v precipitáte, zatiaľ čo vhodné využitie solí, alebo kyselín obvykle vedie k vyššej čistote supernatantu [77]. Na prekonanie týchto problémov je preto možné navrhnúť kombináciu rôznych prístupov a zlučiteľných rozpúšťadiel.

Súčasným trendom je výber takého činidla, aby nedošlo k prílišnému nariedeniu vzorky, a aby bol zároveň kompatibilný s ďalšími prípadnými spôsobmi úpravy a analytickou metódou. Okrem týchto neselektívnych prístupov, je možné využiť aj

selektívnu precipitáciu. Selektívne zrážanie proteínov sa často využíva v transfúznej medicíne. Jedná sa o metódu, pomocou ktorej je možné získať väčšinu proteínov z lyzátu, za pomoci frakcionácie na podskupiny. Proces závisí od fyzikálnej a chemickej interakcie zrážacích činidiel, s jedným alebo viacerými proteínmi, ktoré majú určité charakteristiky. Vývoj selektívnej techniky zrážania pre konkrétny proteín si vyžaduje identifikáciu vhodného zrážacieho činidla a optimalizáciu postupu zrážania pomocou tohto agens. Niektoré reagenty spôsobujú denaturáciu alebo nepriaznivo ovplyvňujú biologickú aktivitu, či tvoria s bielkovinami komplexy, ktoré pevne viažu proteín [78].

Organické rozpúšťadlá sú schopné odstrániť až  $\geq 95\%$  plazmatických bielkovín. V závislosti na type stanovovanej látky, jej koncentrácii vo vzorke a jej špecifickými i nešpecifickými interakciami, však nie sú vždy najvhodnejšou alternatívou. Najčastejšie sa k precipitácii používa metanol a acetonitril [79].

Väčšina analyzovaných látok sa nachádza pri fyziologických procesoch v organizme vo vodnom prostredí. Pri znížení pH prostredia vzorky dochádza k tomu, že sa kladne nabité aminokyseliny stávajú soľami. Tieto soli sú postupne zo svojho povrchu schopné vyvážovať molekuly vody a stávajú sa vo vode nerozpustnými. Zároveň medzi nimi dochádza, v dôsledku vzájomných hydrofóbných interakcií, k ich agregácii. Táto vlastnosť sa využíva pri precipitácii pomocou kyselín [80]. Ich výhodou je nízke nariadenie vzoriek a vysoká účinnosť precipitácie už pri nízkych koncentráciách, v rádoch jednotiek percent. Avšak, tento spôsob úpravy nie je často kompatibilný so samotným analytom, ktorý môže kvôli nízkemu pH interagovať, alebo môže dochádzať k jeho degradácii a rozkladu.

Anorganický proces vysolovania proteínov má široké uplatnenie, ako izolačný postup pri regenerácii proteínov v laboratórnom, ale aj priemyselnom meradle. Pomocou proteínovej precipitácie, za využitia solí, je možné získať a následne i reverzibilne regenerovať proteíny, ako sú diagnostické enzýmy, inzulín, ľudský rastový hormón, interferón a mnohé nutrične dôležité proteíny. Pri tomto postupe sa do proteínového roztoku pridáva koncentrovaná soľ, ktorá vytvára zrazeninu bohatú na bielkoviny. Vo funkčnej oblasti vysolovania má soľ špecifický účinok na danú bielkovinu, ktorý závisí od povahy soli a jej koncentrácie. Na určenie vhodnosti sa používa jednoduchá rovnica:

$$\log S = \beta K_s I$$

Kde  $S$  je rozpustnosť danej bielkoviny,  $I$  je iónová sila,  $K_s$  je konštanta špecifická k danému proteínu a danej soli a  $\beta$  je konštanta závislá od bielkoviny a teploty.

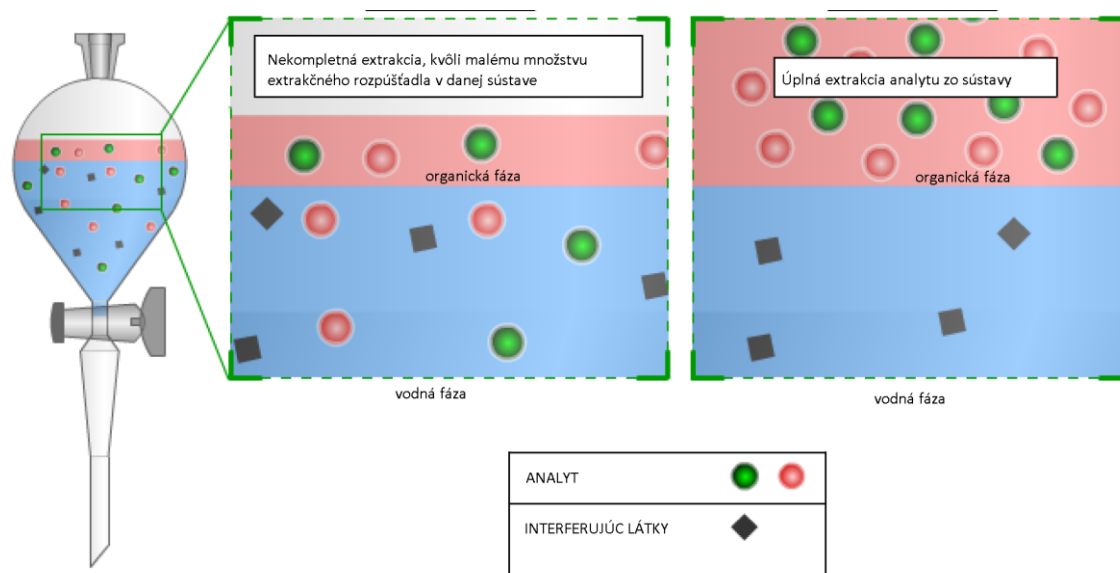
Experimentálne výsledky ukazujú, že polyvalentné anióny v soliach, ako je síran sodný a fosforečnan sodný, majú vyššie hodnoty  $K_s$ , zatiaľ čo polyvalentné kationy, ako je horčík alebo vápnik, znižujú hodnotu  $K_s$ . Preto sa k precipitácii častejšie používajú soli s jednovalenčnými kationmi a polyvalentné anióny, ako napríklad u síranu sodného, alebo amónneho. Síran amónny sa používa častejšie, ako síran sodný, pretože rozpustnosť síranu sodného je relatívne nízka. Relatívna účinnosť solí pri vysolení bielkovín klesá v poradí: citrát > síran > fosfát > chlorid > dusičnan > thiokyanát. Táto séria súvisí s interakciou medzi iónmi a hydrofóbnymi skupinami proteínu. Hydrofóbná časť bielkoviny riadi vysolenie proteínu v soľnom roztoku. Všeobecne sa proteínové molekuly vo vodnom roztoku konformačne stáčajú a počet exponovaných hydrofóbných aminokyselinových zvyškov je minimalizovaný. Dostatočná koncentrácia solí je schopná zmeniť ich konformáciu, čím dôjde k agregácii bielkovín a ich precipitácii [81].

V súčasnosti je trendom miniaturizácia a automatizácia tohto procesu, buď v online, alebo v off-line usporiadaní. Značnú časovú úsporu prináša paralelné spracovanie viacerých vzoriek súčasne, za využitia 96 jamkových doštičiek, nezriedka doplnených robotickými dispenzermi, na prácu s kvapalinami [82] a spájanie rôznych spôsobov úpravy (filtrácia + precipitácia) do jedného automatizovaného systému [83-85], na zvýšenie efektivity a produktivity.



### 3.2.5 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny

Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, tiež známa ako LLE, je proces oddeľovania, pozostávajúci z prenosu rozpustenej látky, z jedného rozpúšťadla do druhého, pričom dve rozpúšťadlá sú, v ideálnom prípade, navzájom nemiešateľné. Často je jedným z rozpúšťadiel voda, alebo vodná zmes a druhým komponentom je nepolárna organická kvapalina (Obrázok 10). Podobne ako vo všetkých extrakčných procesoch, aj pri LLE sa jedná o viacfázový proces, ktorý zahŕňa krok zmiešavania, po ktorom nasleduje samotná separácia fáz. Je dôležité brať do úvahy oba kroky, výber rozpúšťadiel, ich množstvo a spôsob vykonania LLE. Napríklad pri intenzívnom miešaní, výhodnom pri prenose látok z jedného rozpúšťadla do druhého, môže tiež dôjsť k zhoršenej separácii fáz tvorbou emulzií.



**Obrázok 10** Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny v závislosti od pomeru jednotlivých rozpúšťadiel

Rovnováha je dosiahnutá až vtedy, keď je chemický potenciál extrahovateľnej rozpustenej látky rovnaký v oboch fázach. Prakticky toto pravidlo vedie k definícii „distribučného koeficientu“  $K$ , ktorý je možné zapísať takto:

$$K = \frac{C_1}{C_2}$$

kde  $C_1$  a  $C_2$  sú rovnovážne koncentrácie rozpustenej látky v dvoch fázach, respektíve je distribučný koeficient vyjadrením relatívnej preferencie rozpustenej látky, k danému

rozpúšťadlu. V ideálnych prípadoch, kde môže byť predpoklad, že chemický potenciál je úmerný koncentrácii, je distribučný pomer pri danej teplote prakticky konštantný.

Na základe toho je možné dôjsť k predpokladu, že účinnosť procesu LLE je možné zlepšiť úpravou distribučného koeficientu. Napríklad: na extrakciu organickej kyseliny, je výhodnejšie použiť nepochárne rozpúšťadlo, ak nie je disociovaná pri nízkom pH, a vodný roztok, ak vplyvom vysokého pH dôjde k jej disociácii [86]. Problémy spojené s fázovou separáciou, výberom rozpúšťadla a pH vzorky, je potrebné optimalizovať pre každú jednotlivú zlúčeninu, pred samotnou extrakciou vzorky.

Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, sa v bioanalytických aplikáciách všeobecne považuje za jednoduchú a robustnú techniku úpravy. Pri extrakcii ionizovateľných zlúčenín je všeobecne odporúčaným postupom úprava pH vzorky tak, aby bol dosiahnutý neutrálny stav zlúčenín. Na úpravu pH vodnej fázy, sa všeobecne používa akceptované pravidlo  $pK_a \pm 2$ , v závislosti od acidobazických charakteristík analytov. Pri bližšom pohľade na všeobecné rovnice, ktoré popisujú extrakčné správanie ionizovateľných zlúčenín, je žiadúce rozšíriť toto pravidlo úpravy pH tak, že sa vezme do úvahy distribučný pomer a objem oboch kvapalných fáz. Výberom extrakčného pH, na základe tohto rozšíreného pravidla, je možné ovplyvniť selektivitu extrakcie bez straty výťažnosti[87].

LLE sa často používa na zvýšenie selektivity a citlivosti analytických metód, ako spôsob úpravy vzoriek. Avšak, konvenčná manuálna LLE má veľa obmedzení. Je to časovo náročný proces, vyžadujúci veľké nároky na spotrebu chemikálií a vzoriek, čo vedie k zvýšeným nákladom. Celá škála rozpúšťadiel je škodlivá pre životné prostredie, majú karcinogénny a teratogénny efekt. Preto je v poslednom období preferovaná skôr mikroextrakcia a automatizované LLE, pomocou prietokových systémov. Zavedenie paralelnej extrakcie v 96 pozičných mikrotitračných doštičkách značne skrátilo časové nároky extrakcie, za súčasného zníženia spotreby rozpúšťadiel [88-90]. Implementácia LLE v prietokovej injekčnej analýze má radu výhod, ako je znížená spotreba organických rozpúšťadiel, vzoriek, možná automatizácia a s ňou spojená vyššia presnosť a priepustnosť vzoriek s reprodukovateľnými výsledkami. Aj keď väčšina opísaných postupov využívala prietokovú injekčnú analýzu, boli vyvinuté aj ďalšie metódy. Najviac rozšírenou je sekvenčná injekčná analýza s on-line LLE, ale sú opísané aj takzvané lab-at-valve mikroextrakčné prístupy [91].

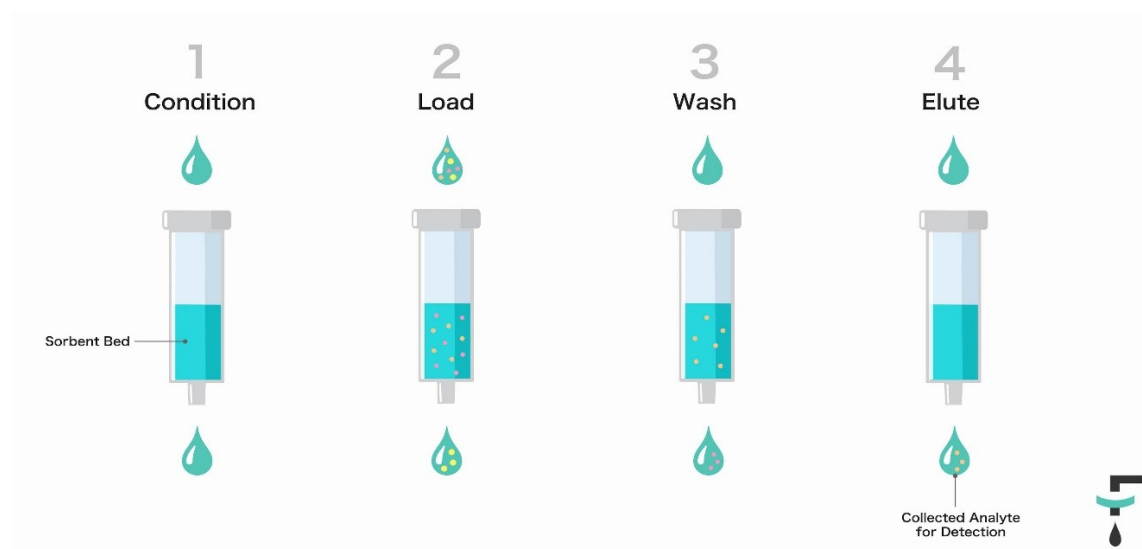
Okrem využitia automatizovaných techník dochádza aj k ich miniaturizácii, kde najčastejšími využívanými prístupmi sú disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do

kvapaliny - DLLME, pevnou látkou podporená extrakcia z kvapaliny - SLE, elektro  
membránová extrakcia - EME, mikroextrakcia na jednej kvapke - SDME, mikroextrakcia  
z kvapalnej fázy pomocou dutého vlánka HF-LPME a paralelná mikroextrakcia pomocou  
umelej kvapalnej membrány – PALME [92, 93].

### 3.2.6 Extrakcia pomocou pevnej fázy

Extrakcia pomocou pevnej fázy (SPE), sa používa na izoláciu cieľových zlúčenín z kvapalných médií, pomocou adsorpcie na granulovanom pevnom lôžku, ktorý tvorí náplň kolónky, alebo na poréznu tuhú membránu (disk). Po odstránení nežiadúcich komponentov matrice, sa látky desorbujú z tuhého materiálu, za použitia špecifického rozpúšťadla alebo zmesi rozpúšťadiel. Extrakt sa následne zakoncentruje odparením rozpúšťadla, buď pomocou vákua inertného plynu, alebo redukuje vyvarením. Priama desorpcia zachytených látok do analytického systému (HPLC, SFC, FIA ...), je možná pomocou vhodného online rozhrania. Patrí medzi dominantné techniky úpravy vzoriek pred samotnou chromatografickou analýzou a vyniká radou výhod, ako je vysoká výťažnosť, zakoncentrovanie látok, minimalizácia spotreby organických rozpúšťadiel a hlavne lepšia možnosť automatizácie. Principiálne je SPE podobné chromatografickému procesu. Zložka s vyššou afinitou k pevnej fáze, sa bude zadržiavať viac, než iné komponenty matrice. Výhodou tejto metódy je jej škálovateľnosť, a hlavne možnosť miniaturizácie a automatizácie mikroextrakčných postupov. Samotná extrakcia je dvojjložkový dej, ktorý sa skladá zo zachytenia požadovaných látok na sorbent a ich následnej elúcie. Na to, aby oba tieto deje prebehli úspešne, je potrebné pred samotnou extrakciou niekoľko dodatočných krokov.

Prvým krokom je vždy úprava vzorky tak, aby bola vhodná k extrakcii, teda skvapalnenie vzorky, úprava pH a zloženia rozpúšťadiel tak, aby boli vhodné k SPE. Druhým krokom je úprava samotného sorbentu jeho aktiváciou a ustálením takých podmienok, ktoré budú zodpovedať podmienkam pri aplikácii vzorky [94, 95].



**Obrázok 11** Základná schéma SPE extrakcie

Prevzaté z [https://www.reddit.com/r/chemistry/comments/9j4z4c/beginners\\_guide\\_to\\_solid\\_phase\\_extraction\\_spe/](https://www.reddit.com/r/chemistry/comments/9j4z4c/beginners_guide_to_solid_phase_extraction_spe/)

Pri samotnej SPE je nutné zohľadniť niekoľko faktorov pri výbere sorbentu, v závislosti od extrahovaných látok, ako je selektivita sorbentu voči cieľovým analytom, afinita analytov voči danému sorbentu, kapacita extrakčného systému, a prispôbiť ich fyzikálno-chemickým vlastnostiam vzorky a typu matrice.

Na výber sú sorbenty podobne ako pri kvapalinovej chromatografii, ako:

- silikagél,
- silikagél s chemicky modifikovaným povrchom (C8, C18, ...),
- porézny grafitový uhlík,
- iónovo-výmenné fázy,
- polymérne sorbenty,
- multimodálne sorbenty,
- imunosorbenty,
- polyméry s molekulovými odtlačkami (MIP).

Miniaturizovanou obdobou SPE, vyvinutou k rýchlej predúprave vzoriek v laboratóriu a v mieste odberu, je Mikroextrakcia pomocou pevnej fázy (SPME). Obvykle je malé množstvo extrakčného média, dispergovaného na pomocnom médiu, exponované vzorkou po špecifický čas, než dôjde k jeho desorpcii a analýze. K distribúcii medzi extrakčnou fázou a analytmi dôjde po určitom čase, keď sa dosiahne adsorbčné ekvilibrium, ich distribúcia dosiahne stabilných hodnôt. K dnešnému dňu je vyvinutých niekoľko konfigurácií SPME, ktoré zahŕňajú vlákno, miešadlo, extrakčnú nádobu, suspendované častice, membránu, alebo kapiláru, ako extrakčné médium [96].

V závislosti od prevedenia je SPME možné rozdeliť do troch základných tried (Obrázok 12):

(a) Priamy kontakt extrakčného média so vzorkou

- (disperzné SPE, ukotvenie častíc v nosiči... )

Extraktant je ponorený do roztoku vzorky a analyty sú priamo absorbované na ich povrch.

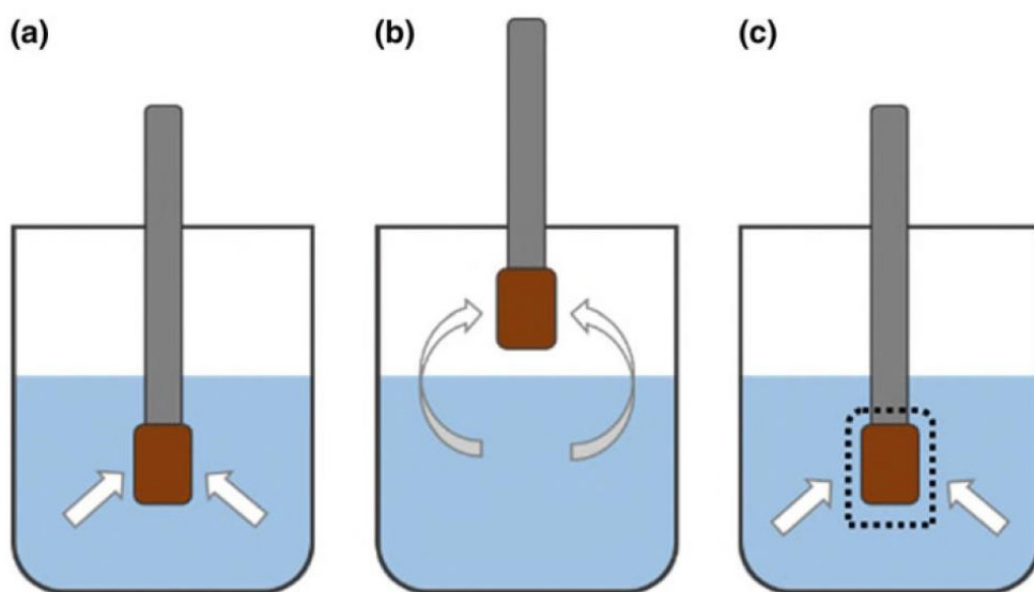
(b) Headspace extrakcia

- extrakcia pomocou dutého, alebo porézneho vlákna,

Extraktant je umiestnený nad vzorkou, aby došlo k dostatočnej difúzii do extraktantu, musia byť analyty prchavé. Dochádza k efektívnemu vyhnutiu interferujúcich makromolekúl v matrici.

(c) Extrakcia cez ochrannú semipermeabilnú membránu

Pomocou ochrannej semipermeabilnej membrány, ktorá bráni prechodu nežiadúcich komponentov, je možné ochrániť extraktant od znečistenia. Táto technika je vhodná najmä pre neprchavé látky alebo vzorky, u ktorých kvôli ich zloženiu nie je možné použiť predchádzajúce techniky.



**Obrázok 12** Názorná ukážka typov SPE extrakcie [96]

Techniky SPE a SPME sú dnes veľmi rozšírené v rutinných, ale aj výskumných laboratóriách, keďže poskytujú radu výhod. Umožňujú zakoncentrovanie a prečistenie extraktu. Majú vysokú selektivitu, vďaka veľkému množstvu dostupných sorbentov a dostupnému prevedeniu. Vykazujú dobrú výťažnosť a oproti LLE, i nižšiu spotrebu rozpúšťadiel. Sú pomerne ľahko škálovateľné a automatizovateľné. Nevýhodou je ich cenová náročnosť, najmä u jednorazových SPE kolóniek, reprodukovateľnosť ich výroby, nutnosť inštrumentálneho vybavenia, viackrokový spôsob prečisťovania a aktivácie sorbentu počas extrakcie, ktorý je možným zdrojom chýb.

### 3.2.7 Derivatizácia

Derivatizácia je proces, ktorým je možné zlúčeninu chemicky premeniť, pričom vzniká nová zlúčenina, ktorá má vlastnosti lepšie prístupné konkrétne zvolenej analytickej metóde. Väčšinou sa jedná o látky, ktoré majú zlú prchavosť, zlú tepelnú stabilitu, nízku kompatibilitu s detekčným systémom, alebo ktoré môžu byť adsorbované v injektore. Tieto analyty by vykazovali nereprodukovateľné plochy, výšky a tvary pík. Niektoré vzorky analyzované napríklad pomocou plynovej chromatografie, vyžadujú derivatizáciu, aby boli vôbec vhodné na analýzu. Ostatné zlúčeniny, ktoré zle reagujú na špecifický detektor, bude možno potrebné označiť inou funkčnou skupinou, aby sa zlepšila detekcia. Derivatizácia môže okrem zlepšenia vhodnosti a odozvy, zlepšiť rozlíšenie medzi zlúčeninami, ktoré sa spolu podieľajú a prekrývajúci sa vrcholmi [97]. Hlavným účelom tohto postupu je:

- konverzia polárneho, alebo neprchavého analytu na relatívne nepolárne alebo prchavé produkty,
- zlepšenie tepelnej stability cieľových zlúčenín,
- zvýšenie odozvy detektora zabudovaním funkčných skupín, ktoré vedú k lepšiemu signálu,
- zlepšenie účinnosti separácie.

Bežne používané derivatizačné reakcie zahŕňajú silyláciu, esterifikáciu, acetyláciu a alkyláciu. Silylačné činidlá reagujú so zlúčeninami obsahujúcimi aktívne vodíkové väzby. Tieto činidlá patria k najbežnejším typom používaným v plynovej chromatografii. Acylačné činidlá reagujú s vysoko polárnymi funkčnými skupinami, ako sú amino a hydroxyskupiny. Alkylačné činidlá sa zameriavajú na aktívny vodík na aminoskupinách a kyslých hydroxylových skupinách. Pre zlúčeniny obsahujúce niekoľko rôznych funkčných skupín, môžu byť potrebné viaceré derivatizačné činidlá. Pri týchto viacstupňových derivatizačných postupoch môže byť potrebné použitie iných typov činidiel, ako napríklad oxím, hydrazón a cyklických derivatizačných látok. Celá škála derivatizačných činidiel je komerčne dostupná na výber, v závislosti od zvolenej reakcie. Čas derivatizácie sa pohybuje od niekoľkých sekúnd, až do desiatok minút. Vhodná derivatizačná sústava by mala viesť k požadovanej chemickej modifikácii a byť reprodukovateľná, účinná a bez nežiadúcich účinkov na analýzu a detekciu.

Väčšina derivatizačných reakcií sa uskutočňuje súčasne s extrakciou, a preto sa označujú ako derivatizácia in situ. Derivatizačné činidlo sa môže buď pridať do roztoku vzorky, alebo do extrakčného rozpúšťadla (derivatizácia in-drop) [98].

Derivatizácia sa môže vykonať pred samotnou analýzou, vtedy o nej hovoríme, ako o predkolónovej derivatizácii, alebo počas separácie po výstupe analytu z kolóny tzv. „post column“. Post column derivatizácie sa vykonávajú iba na zlepšenie detekovateľnosti analytov. Predkolónová derivatizácia sa odporúča, ak reakcia vyžaduje dlhší čas, vyššiu teplotu alebo iné podmienky, ktoré nie sú konzistentné s podmienkami analýzy [99].



## **4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **4.1 Vývoj metódy na klinické monitorovanie metabolitov vitamínu B1 a statusu vitamínu B6, v plnej krvi pomocou kvapalinovej chromatografie**

#### **4.1.1 Úvod do problematiky a cieľ práce**

Vzhľadom na nové zistenia týkajúce sa nutričného stavu, sa analýza vitamínov B1 a B6 a ich vitamérov, stáva čoraz viac súčasťou klinických smerníc po celom svete. Ich stanovenie je harmonizované v programoch zabezpečovania kvality laboratórií a počet metód na ich monitorovanie sa pomaly zvyšuje [27]. Stanovenie tiamínu a jeho biologicky aktívnych foriem v jednom analytickom kroku, spolu s pyridoxal-5-fosfátom, sa však v rutinej diagnostike často nevykonáva.

Ich súbežná analýza je náročná, kvôli nestabilite analytov, rozdielnym fyzikálnym a chemickým vlastnostiam a kvôli zložitosti matrice, v ktorej sa vyskytujú [28]. Na samostatné hodnotenie vitamínového statusu oboch analytov boli vyvinuté rôzne metódy. Najviac sa v klinických laboratóriách v dnešnej dobe využívajú mikrobiologické a enzymatické metódy. Tieto testy sú založené na metabolizácii alebo enzymatickej reakcii s vitamínmi, ktoré slúžia ako regulátory reakcie. Oba prístupy sa však majú radu nevýhod: týkajú sa iba jedného vitamínu, vyžadujú časovo náročnú prípravu / kultiváciu vzorky, sú náchylné na chyby pri manipulácii a na kontamináciu, majú obmedzenú selektivitu a pri použití v malých sériách vzoriek sú relatívne drahé. Súčasným trendom je preto analýza vitamínov pomocou separačných techník, ako sú HPLC, UHPLC a CE, na rýchle zhodnotenie stavu vitamínov bez nutnosti zdĺhavých úprav a kultivácií [8]. Meranie vo vode rozpustných vitamínov, pomocou kvapalinovej chromatografie v reverznom usporiadaní, je relatívne náročné, vzhľadom na ich diverzitu a vysokú polaritu. Pomerne bežnou praxou je preto v chromatografii, na reverznej fáze, použitie iónovo-párových činidiel, na zvýšenie retencie pri separácii.

Cieľom tejto práce bolo, vyvinúť a validovať jednoduchú chromatografickú metódu, na selektívne stanovenie množstva P-5-P, Th a jeho biologicky aktívnych derivátov TDP a TMP v plnej krvi. Na analýzu boli kladené kritériá, aby bola daná metóda rýchla, využívala súčasné prístrojové vybavenie laboratória, bola bez nutnosti iónovo-párových činidiel, relatívne ekonomicky nenáročná, a aby bola vhodná na stanovenie vo veľkých súboroch vzoriek v klinickom výskume.

## **4.1.2 Prístrojové vybavenie, chemikálie a použitý biologický materiál**

### **4.1.2.1 Chromatografický systém**

Na všetky merania bol použitý systém na kvapalinovú chromatografiu od firmy Shimadzu, v modelovej rade Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Prístroj je vybavený on-line degasérom Shimadzu DGU-20A<sub>5</sub> s fluoroetylénovou membránou, dvoma binárnymi vysokotlakými gradientovými pumpami LC-20AB, ktoré operujú v rozmedzí prietokov od 0,0001 až po 10 ml/min, s maximálnym tlakom 40 MPa. Dávkovanie vzoriek zaobstaráva autosamplér SIL-20AC, so zabudovaným pohlcovačom vlhkosti a spolu s modulom Rack Changer/C na 12 mikrotitračných doštičiek, ktoré uchovávajú vzorky v teplotnom rozsahu 4 až 40°C. Autosamplér je schopný dávkovať množstvo vzorky v objeme 0,1 až 100 µl. Na udržanie teploty kolóny pri stanovenej teplote, bol použitý kolónový termostat CTO-20A, s automaticky nastaviteľným teplotným rozmedzím 4-85°C ± 1°C. V systéme bol taktiež zapojený detektor s diódovým poľom SPD-M20A, ktorý ale na analýzu nebol použitý. Na fluorescenčnú analýzu stanovovaných analytov bol použitý fluorescenčný detektor RF-10A<sub>XL</sub> so zberom v rozsahu od 1 do 10Hz a záznamom emisie v rozsahu od 200 do 750 nm ± 2 nm, po excitácii pri vlnových dĺžkach 200 až 650 nm ± 2nm. Celý systém bol automaticky ovládaný pomocou počítača, so softvérom LabSolutions vo verzii 1.21.

### **4.1.2.2 Laboratórne vybavenie**

Na uskladnenie krvných vzoriek a rozrušenie bunkových membrán, bol použitý hlbokomraziaci box GFL 6483 (GFL mbH, Burgwedel, Nemecko). Chemikálie k príprave mobilnej fázy a štandardných roztokov boli navažované na váhach Sartorius LE623S a mikrováhach Sartorius ME5-0CE (Sartorius AG, Göttingen, Nemecko). K úprave pH bol využitý pH meter Sentron SI 400 (Sentron Europe BV, Roden, Holandsko). Na úpravu krvi bola využitá mikrocentrifúga D3024 (Scilogex, Rocky Hill, Connecticut, USA). Extrahované vzorky boli filtrované cez mikrotitračné doštičky, s filtrami (0,2 µm/350 µl AcroPrep 96 filter plates), pomocou vákuového manifoldu na mikrotitračné doštičky (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA), spojeného s vákuovým čerpadlom VAC Space-50 (Chromservis, Praha, Česká republika).

#### 4.1.2.3 Štandardy a chemikálie

Štandardné reagencie Tiamín hydrochloridu (čistota  $\geq 99\%$ ), Tiamín monofosfátu (čistota  $\geq 98\%$ ), Tiamín difosfátu (čistota  $\geq 97\%$ ), pyridoxal-5-fosfátu (čistota  $\geq 99\%$ ), boli zakúpené u firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Chemikálie na derivatizáciu a úpravu vzoriek, hexakynoželezitan draselný (III) (čistota  $\geq 98\%$ ), semikarbazid hydrochlorid (čistota  $\geq 99\%$ ), glycín (čistota  $\geq 99\%$ ), hydroxid draselný (čistota  $\geq 90\%$ ), 70% kyselina chloristá (LC-MS čistota) a metanol čistoty HPLC, boli tiež zakúpené u firmy Sigma-Aldrich.

Certifikovaný referenčný štandard plnej krvi, ako aj krvné kontroly pre TDP a P-5-P, boli zakúpené u firmy Chromsystems (Gräfelfing, Nemecko). Heptahydrát hydrogenfosforečnanu di-draselného ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a monobázický dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) boli zakúpené u firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Ostatné reagencie, kyselina chlorovodíková (35%) a kyselina m-fosforečná (86%), boli zaobstarané od firmy PENTA s.r.o. (Chrudim, Česká Republika). Všetky vodné roztoky boli pripravené za použitia  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  vody, generovanej zo systému Merck Millipore MilliQ, systému reverznej osmózy (Praha, Česká Republika). Ultračistá voda, zo systému reverznej osmózy Goldman Ultrapure water system (Goro, Praha, Česká republika), sa kvôli problematickej kvalite používala iba na začiatku experimentálnej fázy.

#### 4.1.2.4 Príprava štandardných roztokov a derivatizačných činidiel

Zásobný roztok fosfátového pufru o koncentrácii  $1 \text{ mol/l}$ , bol pripravený rozpustením 57,1 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 102,0 g monobázického hydrogenfosforečnanu draselného v jednom litri ultračistej vody a uložený v chladničke. Pracovná mobilná fáza sa každý deň nariedila a filtrovala cez  $0,2 \mu\text{m}$  hydrofilný polypropylénový membránový filter (Pall Corporation, New York, USA).

Derivatizačná zmes, na modifikáciu vitamérov tiamínu na thiochróm, bola pripravovaná každý deň čerstvá, odvážením 250 mg hexakynoželezitanu draselného a rozpustením v 5 ml 3,59 M hydroxidu draselného. Derivatizačná zmes pre vitamín B6 sa pripravovala denne, navážením 1 000 mg semikarbazid hydrochloridu a 1 000 mg glycínu a rozpustením v 1 ml ultračistej vody.

Zásobné roztoky štandardov P-5-P, TDP, TMP a Th boli pripravované ich presným zvážením a rozpustením v 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Všetky

zásobné roztoky boli pripravené v koncentrácii 200  $\mu\text{mol/l}$ . Zásobné roztoky boli alikvotne rozdelené do vialiek a uskladnené pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pracovné roztoky štandardov, boli pripravované na požadované koncentrácie každý deň, riedením zásobného roztoku ultračistou vodou a do derivatizácie a analýzy skladované pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.2.5 Použitý biologický materiál**

Vzorky biologického materiálu použité na vývoj, optimalizáciu extrakčného postupu a chromatografickej metódy, boli poskytnuté dobrovoľníkmi. Vzorky plnej krvi na testovanie finálnej metódy, na reálnych vzorkách pacientov, boli získané od pacientov III. Internej gerontometabolickej kliniky Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Všetci dobrovoľní darcovia poskytli svoj informovaný súhlas, s odberom biologického materiálu. Odber bol schválený Etickou komisiou Fakultnej nemocnice v Hradci Králové (201611-S18P, 24. novembra 2016). Vzorky plnej krvi boli odobrané z kubitálnej žily do 6ml skúmaviek, pokrytých 10,8 mg tridraselnej kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (BD Vacutainer). Po odobraní boli vzorky premiešané, kvôli homogenizácii a okamžite zmrazené pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby došlo k narušeniu bunkových membrán. Vzorky boli v takomto stave uskladňované až do dňa analýzy. V deň analýzy boli vzorky rozmrazené, chránené od slnečného žiarenia, pri izbovej teplote, homogenizované a spracované.

#### **4.1.3 Vývoj HPLC-FLD metódy**

Vývoj metódy nadviazal na predchádzajúcu experimentálnu prácu Mgr. Anežky Slabé (Chadtovej). V tejto práci boli optimalizované podmienky analýzy, ako vlnové dĺžky excitačného a emisného maxima, bola selektovaná vhodná chromatografická kolóna, zloženie mobilnej fázy a boli optimalizované chromatografické parametre, ako prietok, teplota termostatu počas analýzy a množstvo nastrekovanej vzorky. Táto metóda bola testovaná na vzorkách štandardov a na vzorke séra s prídavkom štandardov.

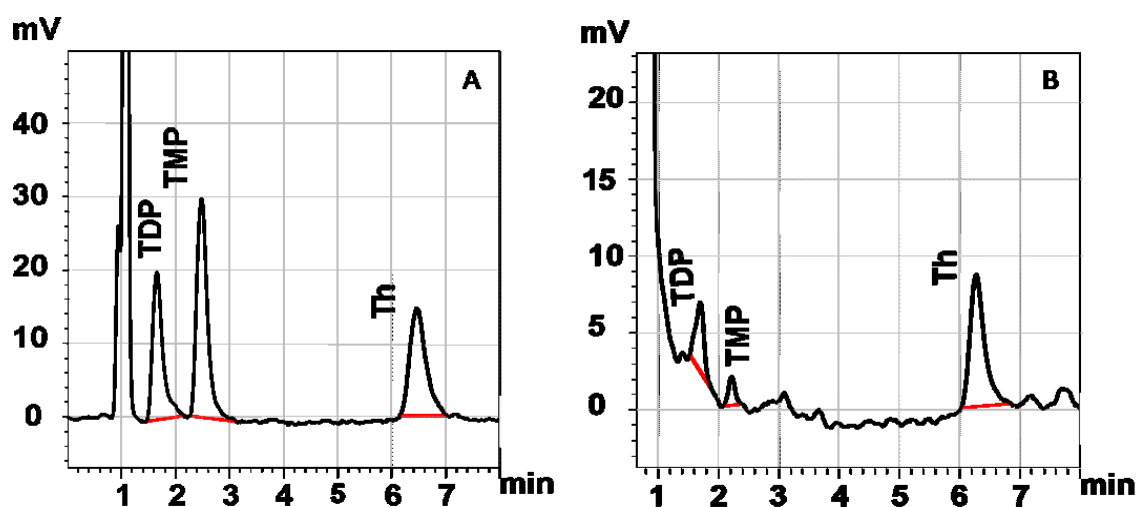
##### **4.1.3.1 Optimalizácia chromatografických podmienok**

Pri optimalizácii metódy bolo prvým krokom zopakovanie podmienok analýzy z predošlých experimentov a následná úprava, ktorá mala optimalizovať podmienky tak, aby bola analýza vhodná pre použitie s biologickým materiálom.

**Tabuľka 7** Prehľad počiatočných podmienok separácie

Parameter	Podmienky
<b>Analytická kolóna</b>	Chromolith® High Resolution RP-18e, 100 × 4,6 mm
<b>Mobilná fáza</b>	A: 95% 10 mmol/l fosfátový pufor o pH 6,5 B: 5% Acetonitril
<b>Prietok</b>	2,5 ml/min, od 2,1 minúty 4 ml/min
<b>Detekcia</b>	Ex: 360 nm    Em: 425 nm f=2Hz
<b>Teplota</b>	35 °C
<b>Nastrekovaný objem</b>	1 µl

Z dosiahnutých výsledkov však bolo zrejmé, že retencia TDP a TMP nie je dostatočná na separáciu od vysoko polárnych interferujúcich látok, prítomných na začiatku chromatogramu. Navyše, zvolený biologický materiál – sérum, nie je ideálny materiál na analýzu vitamérov tiamínu, čo sa prejavilo na ich nízkych koncentráciách a citlivosti merania. Aj z tohto dôvodu bolo potrebné nastrekovaný objem vzorky zvýšiť. Tvar píkov a opakovateľnosť ich hodnôt však bola dostatočná (Obrázok 13). Zo separačného hľadiska sme sa preto rozhodli, zvýšiť separačnú účinnosť, zvolením kolóny v rozmeroch 150 × 4,6 mm (Chromolith® High Resolution RP-18e). Taktiež na ochranu kolóny, bola použitá predkolóna 10 × 4,6 mm (Chromolith® High Resolution RP-18e).



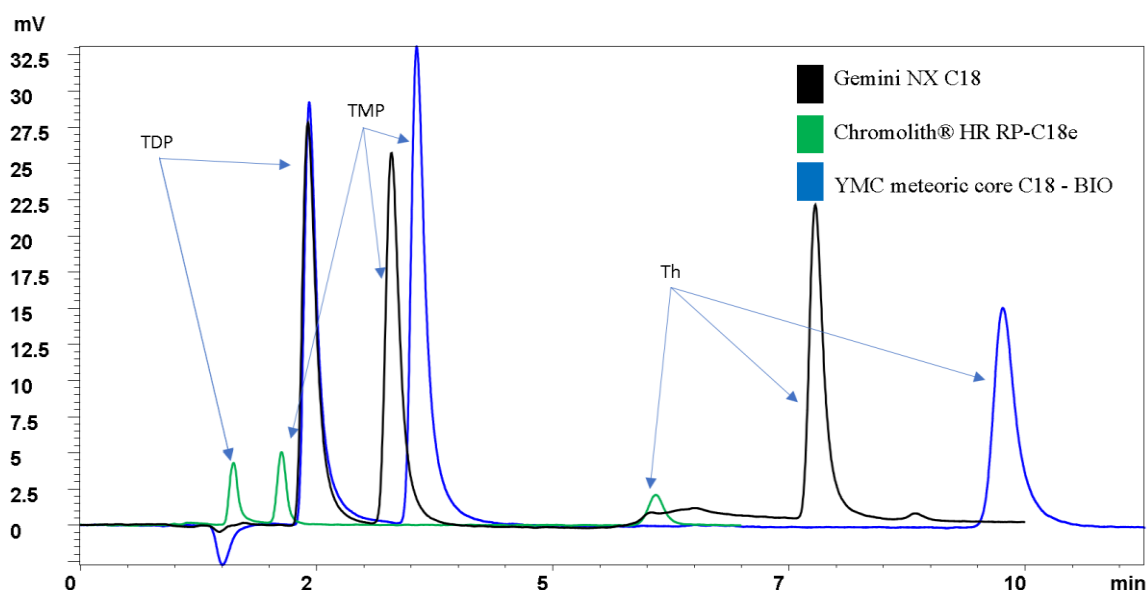
**Obrázok 13** Porovnanie metódy na štandardoch (A) a biologickom materiáli (B)

Pri použití biologického materiálu, danej mobilnej a stacionárnej fázy a navrhovaného extrakčného postupu, dochádzalo k postupnému nárastu spätného tlaku, čo v dlhodobom horizonte, vzhľadom k tlakovým limitáciám prístroja, znemožňovalo použitie skokového gradientu na 4 ml/min. Preto bol skokový gradient upravený na: 0-3 min - 2,5 ml/min, nasledovaný od 3-18 min - 3 ml/min. Retencia vitamérov, aj napriek

úpravám, vzhľadom ku komplexnosti vzorky, nebola dostačujúca. Zníženie množstva acetonitrilu v mobilnej fáze spôsobovalo problémy s fluktuáciou tlaku, ktorá sa odrážala na zázname detektora. Dochádzalo k častým problémom so zrážaním pufru v zmiešavacom ventile, kovových inletoch a kapilárach v binárnej pumpe, kvôli stagnantnému toku acetonitrilu. Aj z tohto dôvodu sme sa rozhodli pre nahradenie acetonitrilu mobilnou fázou, s nižšou elučnou silou – metanolom. Využitie metanolu má svoje výhody v tejto metodike, okrem iných, aj v tom, že zvyšuje fluorescenčnú intenzitu derivátov thiochrómu. K zvýšeniu fluorescenčnej intenzity a nárastu retencie dochádza u týchto derivátov aj vplyvom zvýšeného pH mobilnej fázy. Z toho dôvodu boli testované mobilné fázy s pH 6,5 – 7,5. Vzhľadom na stabilitu a predĺženie životnosti kolóny, s len malým rozdielom v intenzite stanovovaných látok, bolo zvolené pH o hodnote 7. V úprave vzorky došlo k ďalším zmenám, ktoré si vyžiadali na ustálenie podmienok separácie na kolóne, použitie pufru s koncentráciou 25 mmol/l. Kvôli zvýšenému tlaku, sme sa na zníženie viskozity mobilnej fázy, rozhodli zvýšiť teplotu na 45 °C.

Všetky tieto zmeny viedli k hypsochromnému posunu maxima excitačnej a emisnej vlnovej dĺžky na hodnoty Ex: 375 nm a Em: 435 nm. Rovnako bol upravený aj parameter zberu dát fluorescenčného detektora z 2Hz, na maximálnu možnú zbernú frekvenciu 10Hz.

Aj napriek úpravám metódy a extrakčného postupu, nebola dosiahnutá očakávaná separačná účinnosť a rozlíšenie hlavných píkovo od interferujúcich látok. Vysoká spotreba mobilnej fázy, potrebná na dostatočnú separáciu všetkých komponentov na monolitické kolóne, spolu s nižšou účinnosťou separácie, nás nakoniec presvedčila k zmene typu kolóny.






**Obrázok 14** Porovnanie jednotlivých stacionárnych fáz

Kolóny : Gemini NX C18 – čierna, Chromolith HR RP-C18e – zelená, YMC meteoric core C18 – BIO – modrá. TDP - tiamín difosfát, TMP – tiamín monofosfát, Th - tiamín

Oproti monolitckej kolóne boli testované 2 časticové kolóny: Gemini NX-C18  $150 \times 3$  mm, s veľkosťou častíc  $3 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, Kalifornia, USA) a kolóna YMC meteoric core C18 core-shell o rozmeroch  $100 \times 4.6$  mm, veľkosťou častíc  $2,6 \mu\text{m}$  (YMC, Kyoto, Japonsko) (Obrázok 14). Pre porovnanie bola zvolená izokratická separácia zmesi štandardov TDP, TMP a Th o koncentrácii 500 nmol/l. Mobilná fáza A pozostávala z 25 mmol/l fosfátového pufru s pH 7. Mobilná fáza B pozostávala z metanolu (5% pri monolitckej kolóne, 10% pri kolóne Gemini NX C18 s úplne poréznymi časticami a 15% pri kolóne YMC s povrchovo poréznou stacionárnou fázou). Pri monolitckej kolóne bol nastavený prietokový gradient, popísaný vyššie. V prípade časticových kolón bol zvolený prietok 0,8 ml/min. V každom pokuse bol zvolený nástrek 15  $\mu\text{l}$ . Pre každú kolónu bola zvolená teplota 40 °C. Fluorescenčný detektor bol nastavený na excitačnú vlnovú dĺžku 375 nm a emisnú vlnovú dĺžku 435 nm.

**Tabuľka 8** Prehľad použitých kolón

Kolóna	Chromolith High Resolution C18	Gemini-NX C18	YMC meteoric core C18
			
Typ SF	Monolithická	Plne porézne častice	Povrchovo porézne “core-shell” častice
pH stabilita	2 – 7,5	1 -12	1,5 - 10
Veľkosť častíc	-	3 µm	2,6 µm
Veľkosť pórov	Mesopóry: 15 nm (150Å) Makropóry: 1.1 µm (1.1×10 <sup>3</sup> Å)	11 nm (110Å)	8 nm (100Å)
Obsah uhlíka	11 %	14 %	5 %
Rozmery	150 × 4,6 mm	150 × 3 mm	100 × 4,6 mm
Plocha	300 m <sup>2</sup> /g	375 m <sup>2</sup> /g	90 m <sup>2</sup> /g

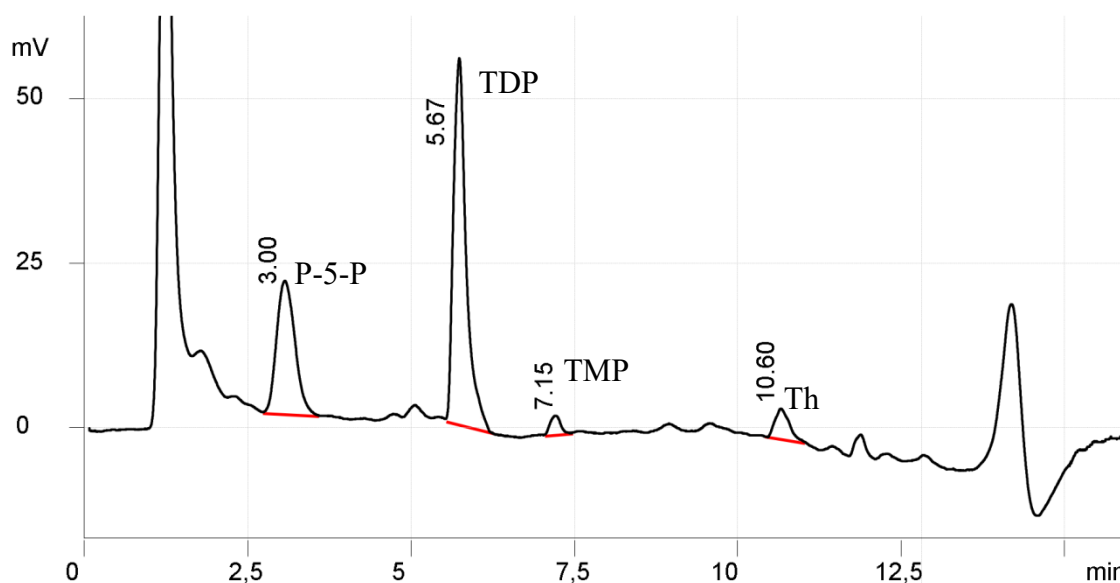
Zo získaných hodnôt bolo usúdené, že najlepšiu separačnú účinnosť sa podarilo dosiahnuť pomocou kolóny YMC meteoric core C18, o rozmeroch 100 × 4.6 mm, veľkosťou častíc 2,6 µm (YMC, Kyoto, Japonsko). Následne boli vykonané ďalšie úpravy separácie, s využitím gradientu mobilnej fázy. Aby došlo k oddeleniu interferujúcich zložiek na začiatku chromatogramu od vitamérov tiamínu, bola zvolená mobilná fáza tvorená z 98% zložkami: 95% 25mmol/l fosfátového pufru a 5% metanolu, použitým, ako mobilná fáza A a 1% bolo tvorené 70% metanolom z mobilnej fázy B. Aby sa skrátil čas analýzy, bol od 2. do 10. minúty zaradený lineárny gradient, až na 40% objemu mobilnej fázy B. Následne došlo k navráteniu podmienok k počiatočnému stavu a k ustáleniu podmienok bola ku koncu analýzy zaradená 3- minútová ekvilibrácia. Celkový čas analýzy u finálnych podmienok trval 15 minút. Finálne podmienky sú sumarizované v tabuľke 9. Reprezentatívny záznam finálnych podmienok separácie je uvedený na Obrázku 15.



**Tabuľka 9** Finálne podmienky separácie

Parameter	Podmienky
<b>Analytická kolóna</b>	YMC meteoric core C-18 core shell, 100 × 4,6 mm, 2,6 µm + Security Guard ULTRA C18-WP 10 x4,6 mm
<b>Mobilná fáza</b>	A: 95% 25 mmol/l fosfátový pufoer o pH 7 + 5% Metanol B: 70% Metanol
<b>Prietok</b>	0,8 ml/min, od 2,1 minúty 4 ml/min
<b>Gradient</b>	1% B 0–2 min, 2-10 min 1–40% B, 1% B 10- 15 min
<b>Detekcia</b>	Ex: 375 nm    Em: 435 nm f=10Hz
<b>Teplota</b>	45 °C
<b>Nastrekovný objem</b>	15 µl

Na základe predchádzajúcej literárnej rešerše boli testované aj iné, alternatívne, prístupy k analýze. Testovalo sa niekoľko druhov pufoerov, ako mravenčanový, acetátový a bikarbonátový pufoer, a aj sodný fosfátový pufoer, v kombinácii s acetonitrilom a metanolom v rôznych percentuálnych pomeroch. Najlepšie výsledky však boli pozorované s draselným fosfátovým pufoerom, ktorý má oproti sodnému výhodu vo vyššej rozpustnosti. Okrem reverznej fázy bola testovaná aj separácia v HILIC usporiadaní, tá však kvôli nízkej opakovateľnosti, problémom so zmenami retenčných charakteristík, hlavne pri použití biologického materiálu, a vysokým limitom detekcie nakoniec nebola využitá.



**Obrázok 15** Príklad separácie pomocou finálnej metódy na vzorke plnej krvi  
P-5-P (t=3,00 min.), TDP (t=5,67min.), TMP (t=7,15), Th (t=10.60)

#### 4.1.3.2 Úprava vzorky pred analýzou

Pri vývoji a optimalizácii extrakčného postupu bol kladený cieľ, aby bol spôsob úpravy vzorky manuálne a časovo nenáročný, aby neznížoval citlivosť analýzy, a aby bol aplikovateľný na veľké série vzoriek v prostredí klinického laboratória. Pôvodne testovaný materiál – sérum, sa kvôli nízkym hladinám biologicky aktívnych vitamérov tiamínu neukázal ako vhodný, preto sme sa rozhodli, okrem séra otestovať aj iné biologické matrice: plazmu, moč a plnú krv. Vzhľadom k nízkym hladinám sledovaných analytov, prítomnosti rušivých komponent matrice a vysokému obsahu proteínov nebolo možné použiť priamy nástrek, ani po niekoľkonásobnom nariadení vzoriek. Pri vývoji sme postupovali podľa postupov opísaných v existujúcej literatúre [1] a vykonali sme modifikácie s cieľom zvýšiť výťažok extrakcie, eliminovať interferencie a prispôsobiť postup vzorkám od pacientov. Optimalizovali sme podmienky extrakcie, vrátane pH vzorky, typu a objemu extrakčného rozpúšťadla, ako aj času a sily centrifugácie.

Na úpravu vzorky boli testované a optimalizované nasledujúce techniky: ultracentrifugácia, precipitácia proteínov acetonitrilom (pôvodná zložka mobilnej fázy), metanolom, etanolom, síranom zinočnatým, zmesou rozpúšťadiel a kyselinami (kyselina chlorovodíková, perchlórová kyselina, kyselina trichlóroctová) v rôznych pomeroch. Okrem deproteinácie bola testovaná aj extrakcia tuhou fázou (SPE), vysol'ovacia a vymrazovacia LLE extrakcia na vzorkách zmesi štandardov natívnej a obohatenej krvi o štandardné látky.

Pri porovnaní jednotlivých druhov biologických matríc, sa najvhodnejšou ukázala byť plná krv. V moči je možné pozorovať tiamín až po saturácii organizmu, a jeho hladina silne závisí od denného príjmu potravou. Navyše sa v moči, za fyziologických podmienok, nevyskytujú fosforylované formy vitamínu B1 a ich prítomnosť môže signalizovať poruchu glomerulárnej filtrácie [100]. Vitamín B6 sa taktiež v moči vyskytuje až po metabolizácii, ako kyselina pyridoxová. Plazma, rovnako ako sérum, je vhodným materiálom na analýzu voľného neviazaného tiamínu, pyridoxínu a intermediátov pyridoxamínu a tiamín monofosfátu. Väčšina biologicky dostupných foriem oboch vitamínov sa ale nachádza v krvných bunkách. To potvrdili aj naše experimenty, preto sme sa rozhodli pre analýzu vzoriek plnej krvi.

Ako prvá extrakčná technika bola v našich experimentoch použitá deproteinácia organickými rozpúšťadlami v pomeroch 0,5:1 , 1:1, 2:1, 3:1 a 4:1 (v/v). Na dosiahnutie spoľahlivej deproteinácie plnej krvi bolo potrebné veľké množstvo organického rozpúšťadla, čo značne nariedilo vzorky a znížovalo detekovateľnosť stanovovaných analytov. Najlepšími rozpúšťadlami boli acetonitril a metanol v pomere 3:1. U acetonitrilu však nedochádzalo ku kompletnej precipitácii hemoglobínu, čo sa prejavovalo na sýtočervenej farbe supernatantu. Pri 3% roztoku síranu zinočnatého bolo na získanie číreho supernatantu potrebné použiť pomer 2:1 voči krvnému lyzátu. Síran zinočnatý nebol najvhodnejšou alternatívou, keďže reagoval

s derivatizačnými reagensiami a znižoval fluorescenčnú intenzitu. Účinnosť precipitácie korelovala s literárnymi údajmi, uvedenými v tabuľke 10.

**Tabuľka 10** Účinnosti deproteinácie v ľudskej plazme na celkový obsah bielkovín podľa [77]

Činidlo (n=3)	Pomer činidla k plazme						
	0,5:1	1:1	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1	4:1
ZnSO <sub>4</sub>	89,2%	96,8%	96,8%	99,0%	99,0%	99,0%	>99,9%
ACN	3,6%	88,7%	91,6%	92,1%	93,2%	93,5%	94,9%
EtOH	0,1%	78,2%	87,2%	88,1%	89,8%	91,8%	92,0%
MeOH	13,4%	63,8%	88,2%	89,7%	90,0%	91,1%	91,5%
TCA	91,4%	91,8%	91,5%	91,0%	91,2%	91,3%	91,4%

**Legenda:** ZnSO<sub>4</sub>- síran zinočnatý, ACN – acetonitril, EtOH – etanol, MeOH – metanol TCA – trichlóroctová kyselina

Taktiež bola testovaná kombinácia metanolu so síranom zinočnatým, kde sa najlepší ukázal byť pomer 1:1:1. Spôsobovalo to ale zhoršenie separácie a problémy v opakovateľnosti merania. Na odstránenie kyseliny trichlóroctovej bolo potrebné odstránenie kyseliny terc-butylmetyléterom alebo dietyléterom, alebo sa táto kyselina musela neutralizovať veľkým objemom roztoku hydroxidu draselného. Neutralizácia značne nariedovala vzorky a vymývanie rozpúšťadlami bolo značne časovo náročné a produkovalo veľké množstvo organického odpadu. Najlepším deproteinačným činidlom sa v našich experimentoch ukázala byť 70% kyselina perchlórová, ktorá už v pomere 0,15:1 účinne odstránila všetky nežiadúce komponenty extraktu a zanechala číry extrakt. Jej nevýhodou je pomerne agresívne prostredie, ktoré neprospieva kolóne ani analytom samotným. Nízky faktor riedenia je však výhodný, kvôli nízkemu nariedeniu vzorky.

Okrem precipitácie boli testované aj alternatívne spôsoby úpravy a zakoncentrovania vzorky. Pri „salting-out“ LLE na zmesi štandardov po derivatizácii bolo možné niekoľkonásobne zakoncentrovať analyty. Ako vysol'ovacie činidlo pre metanol bol, na základe literárnych zdrojov, zvolený uhličitan draselný [101]. U reálnych vzoriek však po prečistení pravdepodobne dochádzalo k interakciám s podávanou medikáciou, krvnými komponentami a nízkej výťažnosti extrakcie (Obrázok 16).



**Obrázok 16** Porovnanie salting out LLE na zmesi štandardov (vľavo) s vybranou vzorkou plnej krvi u pacienta (vpravo)

Dôvodmi boli pravdepodobné interakcie medzi zlúčeninami použitými na extrakciu a spracovanie vzorky.

Ďalšou skúmanou technikou úpravy vzoriek, bola tzv. vymrazovacia, alebo „freezing out“ extrakcia. Z dostupnej literatúry bolo zvolené ako vymrazovacie činidlo acetonitril, slúžiace aj ako deproteinačné činidlo v pomere 1:1, spolu s malým prídavkom síranu meďnatého (150mg) [102]. Vzorky boli po centrifugácii pri  $10000 \times g$  uložené do mraziaceho boxu pri  $-23^{\circ}\text{C}$  a ponechané k fázovej separácii po dobu 1 hodiny. Následne bola odoberaná spodná vodná fáza a analyzovaná pomocou kvapalinovej chromatografie. U „freezing out“ LLE dochádzalo vplyvom komponent matrice, k rôznym interakciám znemožňujúcim tvorbu dvojfázového komplexu a nízkej výťažnosti extrakčného postupu.

Testovaná bola aj metóda extrakcie pomocou tuhej fázy SPE, modifikovaná podľa našich experimentálnych podmienok na dvoch fázach: Spe-ed C18 (500mg/3ml), Supelclean (500mg/3ml) [103, 104]. Počas premývacieho kroku, však, dochádzalo k výrazným stratám, a tým i nízkej výťažnosti esterifikovaných derivátov. Bohužiaľ, kvôli veľkému rozsahu polarít vitamínov a derivátov, sme pozorovali interakcie, ktoré si vyžadovali použitie viacerých krokov na prekonanie týchto problémov, a preto táto aplikácia nebola vhodná na bežné použitie. Navyše, nejednotnosť jednotlivých opakovaní na biologickom materiáli, nás viedla k odklonu od tejto metodiky.

Pri porovnávaní rôznych techník bolo zrejmé, že variabilita testovaných vzoriek plnej krvi (polymorbídny pacienti s rôznou diagnózou) bude mať zásadný vplyv na výber extrakčného postupu. Z toho dôvodu sme zvolili jednoduchú techniku proteínovej precipitácie, za použitia perchlórovej kyseliny. Deproteinácia bola podporená 10 minútovým uskladnením pri  $4^{\circ}\text{C}$ .

Homogenita vzorky počas precipitácie zohráva kľúčovú úlohu, lebo môže zásadným spôsobom vplývať na finálny obsah cieľových analytov. Počas tejto experimentálnej práce sme zistili, že pri zrážaní bielkovín dochádza v úzkych plastových mikro-skúmavkách typu „V“

k nerovnomernej tvorbe zrazeniny a tvorbe precipitačnej krusty. Tá zabráňovala zrazeniu spodnej časti vzorky a prispievala k problémom s opakovateľnosťou analýz. Použitie mikro-skúmaviek typu „U“ je preto nevyhnutné na dosiahnutie rovnomernej precipitácie.



**Obrázok 17** Porovnanie komerčne dostupných mikroskúmaviek

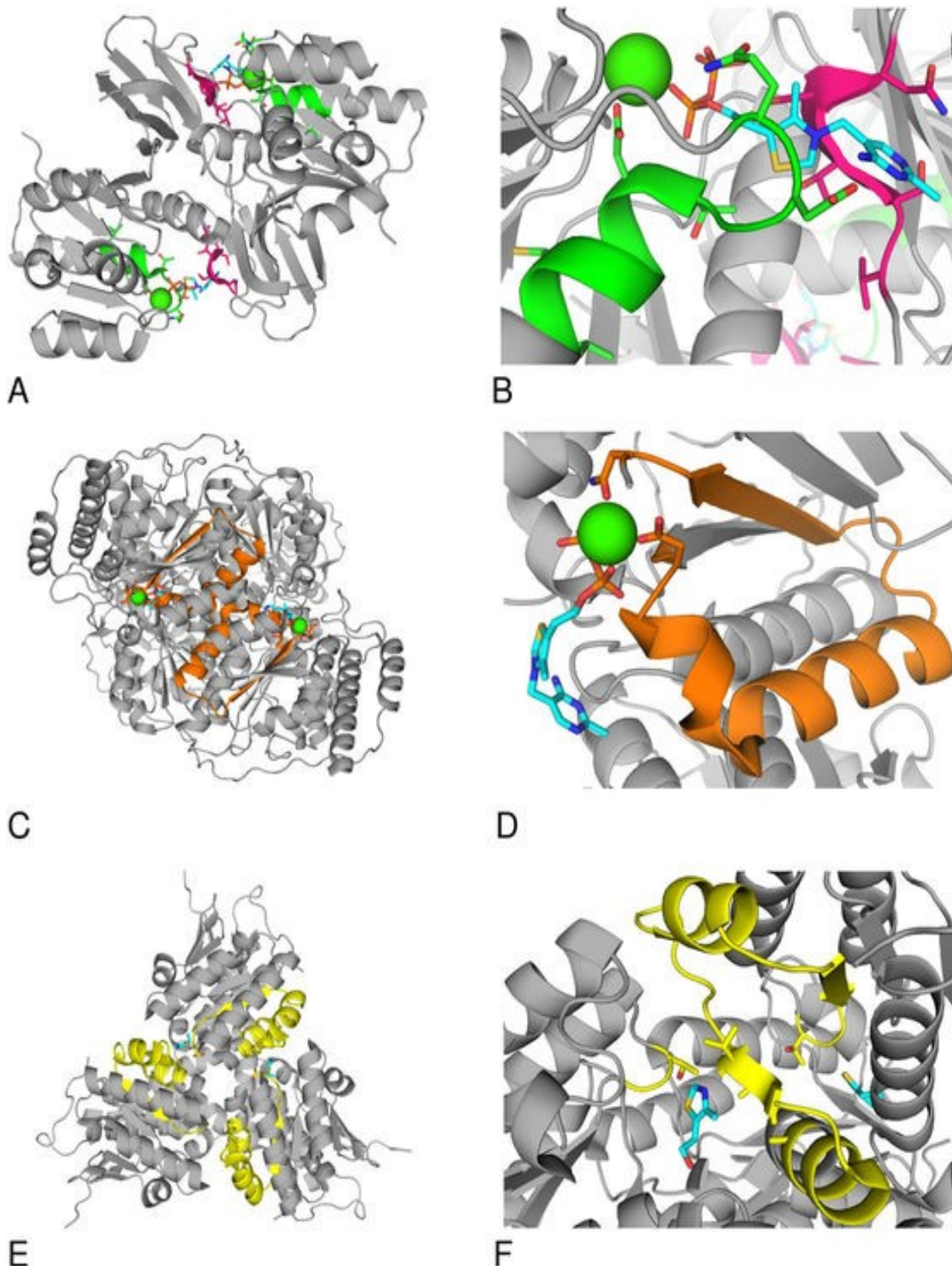
Typ U – vľavo, typ V - vpravo

Ďalšími problémami počas úpravy krvných vzoriek boli vysoká variabilita viskozity, kvôli podielu vody vo vzorke analyzovaného materiálu a interakcia sedimentu so stanovovanými analytmi. Aby sa predišlo variabilite, bolo nutné krvný lyzát pred úpravou nariediť. Zároveň bolo potrebné upraviť podmienky pH tak, aby došlo k uvoľneniu tiamínu a jeho derivátov z enzymatických komplexov [105] (Obrázok 18).

Z toho dôvodu boli vzorky riedené 0.1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri pomere 1:1 (v/v). Nariedenie zmenilo pH z hodnoty 7,3 - 7,4 na pH približne 4,4 čo taktiež vyústilo v lepšiu účinnosť extrakcie. Pre porovnanie je v Tabuľke 11 uvedená zmena pH vzorky krvi po prídavku 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkovej.

**Tabuľka 11** Porovnanie zmeny pH krvi po prídavku 0,1M HCl

pH vzorky krvi ( $\bar{A}$ ; n=3)	pomer HCl k vzorke	Vypočítaná koncentrácia HCl (mol/l)
7,39	1	0,100
7,06	0,1:1	0,091
5,89	0,5:1	0,067
4,40	1:1	0,050
4,10	1,1:1	0,048
1,43	2:1	0,033



**Obrázok 18** Aktívne miesta väzby TDP, TMP a Th na plazmatických proteínoch [105]

**A, B** – vzory väzieb TDP (označené **zelenou** a **ružovou** farbou) v tiamín difosfokináze (**A** – dimér, **B** – pohľad zblízka). **C, D** – motív viažuci TDP u enzýmov závislých od TDP (označené **oranžovou** farbou) v transketoláze (**C** — dimér, **D** – pohľad zblízka). **E, F** – Schéma väzby 4-metyl-5- (2-hydroxyetyl) -tiazolu (označeného **žltou** farbou) ako špecifického tiamínového fragmentuu (**E** – znázornenie triméru, **F** - pohľad zblízka). Základné väzobné časti sú zobrazené ako čiary rovnakej farby, akú má väzobné miesto. Kovové ióny aktívneho miesta sú zobrazené **zelenou** farbou; ďalšie ligandy sú v **azúrovej**; heteroatómy sú zobrazené podľa spoločného farebného kódu: **červená** pre kyslík, **modrá** pre dusík, **žltá** pre síru, **oranžová** pre fosfor.

Na neutralizáciu deproteinačného činidla a kyseliny chlorovodíkovej bol použitý hydroxid draselný. Po minútovej homogenizácii nasledovala desaťminútová centrifugácia, ktorá pomohla sedimentovať lyzované krvné bunky spolu so vzniknutým chloristanom draselným. Výsledkom bol číry, bezfarebný supernatant. Supernatant bol následne v dvoch krokoch derivatizovaný hexakynoželezitanom draselným na oxidáciu tiamínu a jeho derivátov na thiochróm a jeho deriváty a zmesou semikarbazidu / glycínu na derivatizáciu pyridoxal-5-fosfátu. Pridanie metanolu po derivatizácii bolo zvolené na zvýšenie intenzity fluorescence. Hodnota pH vzorky bola zvýšená na zásadité pH, aby sa podporila derivatizačná reakcia, a následne stabilizovaná 25 µl kyseliny metafosforečnej na zvýšenie stability derivatizačných produktov, ktoré mali tendenciu pomaly časom degradovať. Výsledná hodnota pH vzoriek bola v rozmedzí  $\pm 0,2$  pH jednotiek od pH mobilnej fázy. Po všetkých extrakčných procedúrach nasledovala filtrácia cez vákuový manifold do mikrotitračnej doštičky, cez filtračnú doštičku s veľkosťou pórov 0.2 µm (Pall Corporation, New York, USA).

#### **4.1.4 Finálne podmienky analýzy**

##### **Chromatografické podmienky**

LC systém: HPLC Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Kolóna: YMC meteoric core C18, 100 × 4.6 mm, 2,6 µm (YMC, Kyoto, Japonsko), s predkolónou SecurityGuard ULTRA cartridge C18-WP 10 x4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), teplota 45°C

Mobilná fáza:

Zložka A: 95% 25mmol/l draselný fosfátový pufo, pH7, 5% metanol

Zložka B: 70% metanol

Gradientová elúcia, 0,8 ml/min:

Na začiatku metódy bol do druhej minúty na elúciu použitý gradient 1% zložky B v zložke A. Od druhej minúty do desiatej minúty bol použitý pozvoľný gradient od 1–40% zložky B. Gradient bol nasledovaný skokovým návratom k pôvodným podmienkam (1% B) a kolóna bola celkovo päť minút ponechaná na ekvilibráciu pôvodných podmienok.

Objem nástreku: 15 µl

Detektor:

Excitačná vlnová dĺžka : 375 nm

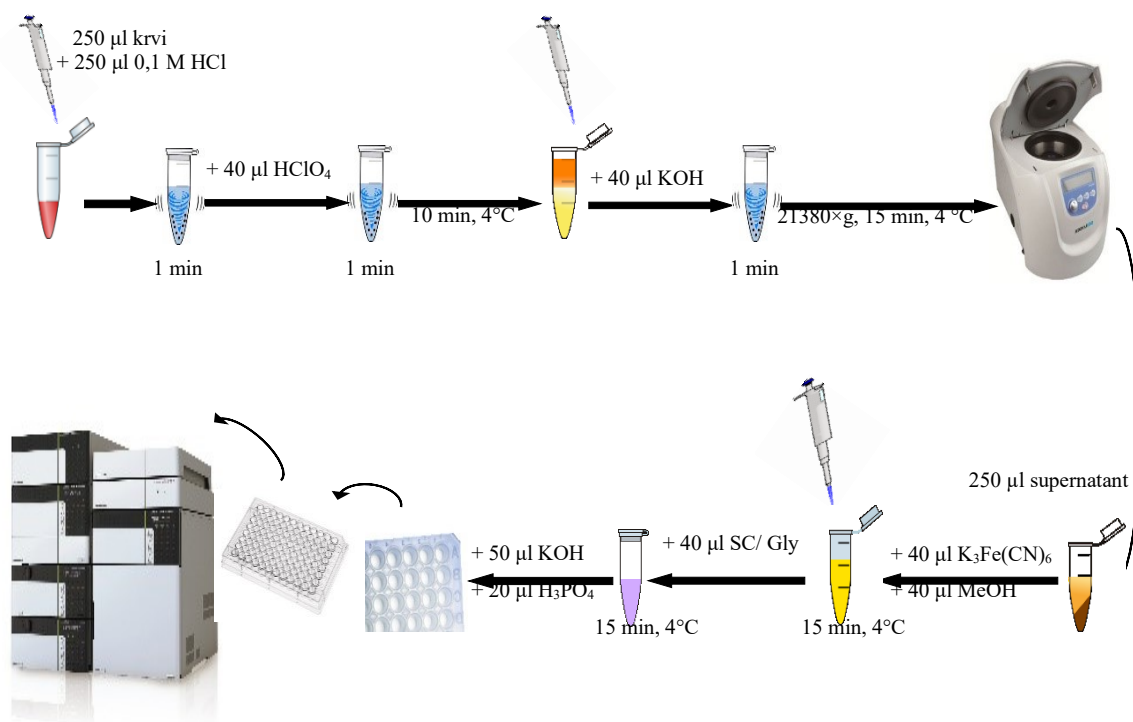
Emisná vlnová dĺžka: 435 nm

Frekvencia zberu dátových bodov: 10 Hz (100 ms)

**Extrakčný postup**

Vzorka krvi bola odobraná z kubitálnej jamky do 6 ml skúmaviek, pokrytých 10,8 mg dihydrátu disódnej soli kyseliny etiléndiamíntetraoctovej, na zabránenie zrážania krvi (BD Vacutainer – svetlo ružový uzáver). Po homogenizácii bolo odobraných 600 µl krvi v dvoch alikvótoch a krv bola okamžite zmrazená pri - 80°C. Tým došlo k lýze buniek a vzorky boli pri tejto teplote uchovávané až do ich analýzy. V deň analýzy boli vzorky rozmrazené pri izbovej teplote, na tmavom mieste, znovu homogenizované a spracovávané. Najprv sa 250 µl krvného lyzátu, štandardu, alebo kontroly zmiešalo s 250 µl 0,1 mol/l roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Po premiešaní na trepačke bolo pridaných 40 µl 70% perchlórovej kyseliny, čím bola dosiahnutá jej koncentrácia v roztoku 0,85 mol/l. Následkom jej pridania došlo k precipitácii proteínov a agultinácii bunkových remnantov. Vzorky boli po dobu jednej minúty premiešavané na trepačke a precipitácia bola podporená ponechaním vzoriek na desať minút v chladničke pri 4 °C. Po desiatich minútach bola perchlórová kyselina neutralizovaná pridaním 40 µl hydroxidu draselného o koncentrácii 3,89 mol/l. Nasledovalo premiešanie vzorky na trepačke po dobu približne jednej minúty, aby došlo k viditeľnému oddeleniu zrazeniny z povrchu skúmavky a homogenizácii vzorky. Vzorka bola následne centrifugovaná (21 380×g, 15 min, 4 °C).





**Obrázok 19** Schéma extrakčného postupu

Z každej vzorky bolo, do novej uzatvárateľnej mikroskúmavky odobraných 250 µl supernatantu, ktorý bol okamžite podrobený derivatizácii pomocou 40 µl čerstvo pripraveného hexakyanoželezitanu draselného (152 mmol/l) rozpusteného v 3,89 mol/l hydroxidu draselného. Na zvýšenie intenzity fluorescencie derivátov thiochrómu bolo pridaných 40 µl metanolu. Derivatizačná reakcia bola ponechaná 15 minút pri 4°C. Následne došlo k derivatizácii pyridoxal-5-fosfátu pomocou 40 µl zmesi semikarbazid/ glycín (semikarbazid o koncentrácii 2,24 mol/l, glycín o koncentrácii 3,33 mol/l). Vzorky boli následne ponechané 15 minút pri 4 °C v chladničke. Finálna derivatizovaná zmes bola následne alkalizovaná pridaním 50 µl hydroxidu draselného o koncentrácii 3,89 mol/l a na zabránenie degradácie thiochrómu bolo pridaných 20 µl kyseliny m-fosforečnej. Táto zmes bola prefiltrovaná pomocou vákuového manifoldu, cez 0.2 µm 96-pojamkovú mikrotitračnú doštičku, do tmavej mikrotitračnej doštičky. Doštička bola uzavrená a chránená pred svetlom a bola analyzovaná pomocou HPLC. Postup je schématicky znázornený na Obrázku 19. Celý protokol bol schválený etickou komisiou Fakultnej Nemocnice v Hradci Králové. Všetci dobrovoľní darcovia a pacienti boli vyrozumení s účelom odberu a podpísali informovaný súhlas.

#### 4.1.5 Validácia metódy

Metóda bola validovaná na základe doporučení pre validáciu bioanalytických metód, ktoré sú uvedené v smerniciach: Guideline on bioanalytical method validation (European Medicine Agency, EMA) a Bioanalytical method validation – Guidance for industry (Food and Drug Administration, FDA) [106, 107]. Zároveň, došlo k overeniu metódy pomocou certifikovaných kontrolných vzoriek a kalibrátorov pre TDP a P-5-P (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Nemecko). Keďže oba vitamíny plnia vitálnu funkciu v biologických procesoch, vyskytujú sa fyziologicky v biologickej matrici, nebolo možné použiť tzv. „blank“ – materiál neobsahujúci dané analyty k validácii.

##### 4.1.5.1 Vybrané validačné parametre

###### Selektivita

U selektivity je hodnotená schopnosť diferencovať analyty od endogénnych komponentov, vyskytujúcich sa v matrici a vzorke samotnej. Štandardne je hodnotená na aspoň 6 rozdielnych, analyzovaných zdrojoch matrice. Porovnávali sme krvné vzorky spracované bez, a s prídavkom stanovovaných látok, so separáciou zmesi štandardných látok. Chromatografické charakteristiky merania sú sumarizované v tabuľke 12.

**Tabuľka 12** Vybrané parametre testu spôsobilosti systému, selektivity metódy a štúdie špecificity

Analýt		P-5-P	TDP	TMP	Th
Rozlíšenie		3,180	8,864	5,693	12,763
Šírka píku (1/20)		0,334	0,521	0,524	0,348
Asymetria (Faktor chvostovania)		1,039	1,499	1,441	1,091
Presnosť(MID)	STD	1,569	1,345	1,453	1,898
% RSD (n=6)	WB	1,999	1,317	1,661	2,343

MID: stredná hladina (100 nmol/L) STD: štandard. WB: celá krv. RSD: relatívna štandardná odchýlka

Z nameraných výsledkov je možné potvrdiť dobré rozlíšenie, primerané retenčné časy stanovovaných analytov a symetrický tvar ich píkov, ktoré sú indikátormi selektívnej metódy. Taktiež bola potvrdená absencia výrazných interferencií v matrici a z procesu úpravy vzorky.

Použitie vnútornej štandardizácie nebolo pri tejto metóde zavedené, kvôli ťažkostiam pri získavaní požadovaných vnútorných štandardov v dostatočnej čistote. Medzi testované vnútorné štandardy patrili: pyritiamín, chlóretyltiamín a acetyltiamín. Všetky obsahovali zvýšené percento fosforylovaných vitamérov a voľnej formy tiamínu, ktoré falošne zvyšovali ich stanovený obsah vo vzorke. Okrem týchto interferencií, vykazovali všetky potenciálne vnútorné štandardy nižšie intenzity fluorescencie, a preto museli byť použité v oveľa vyšších koncentráciách ( $\mu\text{mol/l}$  vs.  $\text{nmol/l}$  koncentrácie stanovovaných analytov).

### **Linearita a kalibračná krivka**

Na stanovenie linearity metódy a kalibračného rozsahu bola zostrojená kalibračná krivka, za použitia zmesí roztokov o známej koncentrácii. Validačné smernice odporúčajú na kontrolu kalibračnej krivky, minimálne 6 koncentračných hladín, v minimálne dvoch replikátoch. Na výpočet koncentrácie neznámej vzorky, taktiež odporúčajú výber najjednoduchšieho modelu, ktorý adekvátne popisuje vzťah medzi koncentráciou a odozvou meracieho zariadenia. Metóda môže byť akceptovaná ako lineárna, ak má faktor odozvy pre všetky analyty menší ako 15%. V nami zvolenom kalibračnom rozsahu, ktorý odpovedá fyziologickým aj patologickým koncentráciám analytov, mala kalibračná krivka lineárnu odozvu. Linearita bola kontrolovaná pomocou štatistickej analýzy testu spôsobilosti súčtu štvorcov (lack of fit test – F-test), v rámci 99% intervalu spoľahlivosti ( $\alpha = 0,01$ ). Pre daný počet dátových hodnôt, je konfidenčný interval  $< 3,39$ . Kalibračná krivka bola kontrolovaná aj pomocou opakovaných meraní komerčne dostupných kalibrátorov a certifikovaných referenčných materiálov NIST, s vysokou a nízkou koncentráciou sledovaných látok.

**Tabuľka 13** Determinanty kalibračnej krivky pre P5P, TDP, TMP a Th

Analyty	P-5-P	TDP	TMP	Th
Kalibračný rozsah	10-400 nmol/L	5-400 nmol/L	6-200 nmol/L	5-200 nmol/L
Regresná rovnica	$y=9,656 \times 10^{-4}X + 1,221$	$y=2,665 \times 10^{-4}X + 2,918$	$y=2,665 \times 10^{-4}X + 1,254$	$y=3,186 \times 10^{-4}X + 1,502$
Koeficient determinácie ( $R^2$ )	0,99991	0,9992	0,9995	0,9997
Factor odozvy(%RSD)	9,302	9,898	9,775	6,583
F test ( $\alpha \leq 0.01$ ) (Ftab= 3.39)	0,71	1,87	1,45	0,33
LOD (nmol/l) (S/N=3)	2,50	1,31	1,55	1,28
LOQ (nmol/l) (S/N=10)	8,32	4,35	5,17	4,27

RSD: relatívna štandardná odchýlka. Ftab: tabuľková hodnota F testu. LOD: limit detekcie. LOQ: limit kvantifikácie. S/N: pomer signálu k šumu

Uspokojivá linearita v skúmanom rozsahu, je vyjadrená hodnotami koeficientu determinácie uvedenými v tabuľke 13, ktoré boli vždy vyššie ako  $R^2 = 0,9992$ . Hodnoty LOD a LOQ, sú uvedené v tabuľke 13. Všetky hodnoty koncentrácie LOQ, sú podľa dostupných literárnych údajov pod referenčnými hodnotami pre tieto vitamíny a vitaméry, ktoré sú: 20–200 nmol/l pre P-5-P, 50–200 nmol/l pre TDP, 6–45 nmol/l pre TMP a 5 –60 nmol/l pre Th.

### Precíznosť metódy

Presnosť analytickej metódy vyjadruje blízkosť zhody, medzi opakovanými meraniami cieľových látok. Je vyjadrená variačným koeficientom. Presnosť by mala byť stanovovaná medzi jednotlivými meraniami a medzi rôznymi meraniami, na viacerých koncentračných hladinách. V Tabuľke 14 udávame hodnoty s najväčšími rozptylmi, pomocou variačného koeficientu a štandardnej odchýlky medzi jednotlivými meraniami, aby bolo možné vidieť rozptyl hodnôt u jednotlivých meraní.

**Tabuľka 14** Porovnanie hodnôt SD a RSD medzi jednotlivými analýzami

Analyt	P-5-P		TDP		TMP		Th	
n=5	SD (%)	RSD (%)	SD (%)	RSD (%)	SD (%)	RSD (%)	SD (%)	RSD (%)
Analýza 1	1,11	0,01	1,59	0,01	0,96	0,03	0,59	0,01
Analýza 2	0,60	0,01	4,80	0,05	0,93	0,07	0,93	0,03
Analýza 3	4,57	0,02	4,57	0,01	0,18	0,01	1,54	0,02

Na kontrolu presnosti medzi rôznymi meraniami (between run precision), boli merané vzorky v troch koncentračných hladinách, analyzované počas rôznych dní. V Tabuľke 14 vykazujeme preto iba hodnoty s najvyššou disperziou počas troch dní, aby sa zjednodušil súbor údajov experimentálnych hodnôt. Tieto hodnoty spĺňajú kritériá uvedené v smerniciach a naznačujú dostatočnú presnosť metódy. Ako je uvedené v Tabuľke 15, výťažky sa pohybovali v rozmedzí 85,83 - 113,82% pre všetky analyzované látky. Tieto výsledky naznačujú, že hodnoty spadali do limitov smerníc EMA a FDA, ktoré špecifikujú, že variácia jednotlivých hodnôt nesmie prekračovať 15% nominálnej koncentrácie.

**Tabuľka 15** Výťažnosť P5P, TDP, TMP and Th

Analyt	P-5-P		TDP		TMP		Th	
	R %	c (nmol/l)	R %	c (nmol/l)	R %	c (nmol/l)	R %	c (nmol/l)
LO	85,88	10	87,01	5	92,05	6	104,22	5
MID	86,31	50	91,25	100	96,48	50	107,37	30
HI	85,83	200	96,52	200	87,90	100	113,82	100
Ā	86,01	-	91,59	-	92,14	-	108,47	-

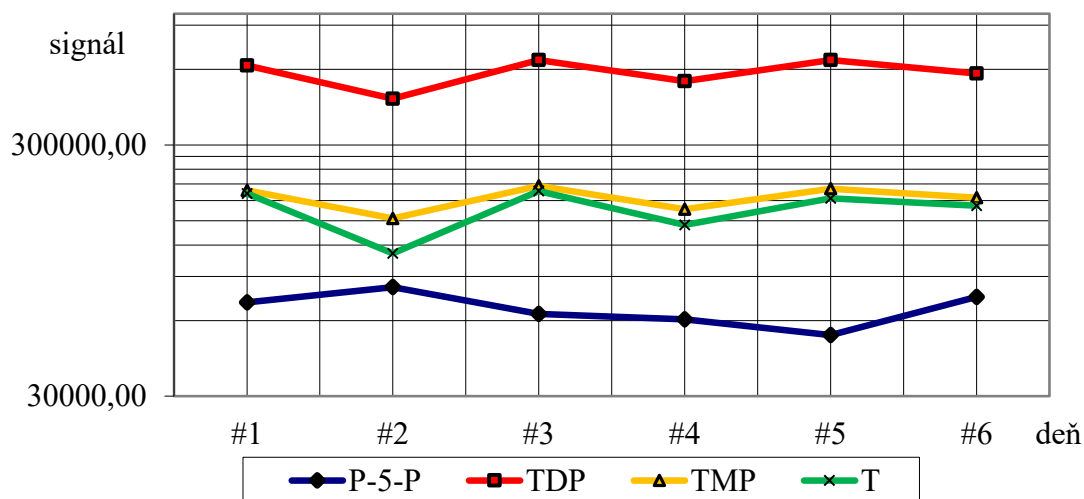
R: výťažnosť. LO: nízka koncentrácia. MID: stredná koncentrácia. HI: vysoká koncentrácia. Ā: priemer

## Stabilita

Zistenie stability vzorky je dôležité na to, aby sa zabezpečilo, že počas prípravy a skladovania vzorky, nedochádza k zmenám v koncentrácii analytov. Priemerná koncentrácia látok by sa nemala odlišovať o viac ako  $\pm 15\%$ , od hodnôt čerstvo analyzovanej vzorky. Nami skúmané analyty majú po spracovaní zníženú stabilitu, ktorá je spôsobená reakciou na svetelné podmienky a teplotu. Je preto potrebné minimalizovať expozíciu svetla, a je nutné počas úpravy udržiavať vzorky v chlade. Stabilitná štúdia bola rozdelená na: stabilitu extraktu po úprave a stabilitu látok vo vzorke krvi.

Pri testovaní stability na zmrazovanie a rozmrazovanie vzoriek, sme opakovane zmrazovali a rozmrazovali kontrolné vzorky krvi a porovnávali sme množstvo stanovovaných analytov. Opakované zmrazovanie nemalo podstatný vplyv na koncentráciu vitamínov a vitamérov vo vzorkách. Z našich experimentov, ale vyplýva, že by sa vzorky nemali zmrazovať viac ako v troch zmrazovacích cykloch. Podobne sme postupovali aj s extrahovanými, derivatizovanými vzorkami v autosampleri a v chladiacom boxe, a opakovane sme ich premeriávali, aby sme zistili stabilitu

finálneho extraktu. Už počas optimalizácie metódy bolo zistené, že sa stanovované látky po úprave vzorky pomaly rozkladajú. Preto, podľa odporúčaní v literárnych zdrojoch, bol finálny extrakt stabilizovaný kyselinou m-fosforečnou, ktorá by mala zabrániť formácii nefluorescentných disulfidových produktov. Rovnako by mala zabráňovať degradácii thiochróm difosfátu na thiochróm monofosfát. Po stabilizácii vzorky chránené pred slnečným žiarením a uchovávané v autosampleri nastavenom na 4°C, nevykazovali výraznú zmenu fluorescence po dobu zhruba 6 dní od ich extrakcie (Obrázok 20).



**Obrázok 20** Stabilita derivatizovaného extraktu po opakovaných stanoveniach

**Legenda:** TDP - červená stopa, TMP - žltá stopa, Th – zelená stopa, a P-5-P - tmavo modrá stopa

Na dlhodobé testovanie stability boli vzorky alikvotované a uskladnené pri -20 °C a -80 °C. Z našich pozorovaní vyplynulo, že uskladnenie pri -80 °C je na dlhodobé skladovanie najvhodnejšie. Pri uchovávaní týchto podmienok a zamedzení prístupu svetla, sa koncentrácia vitamínu B1 a B6 a ich derivátov vo vzorke krvi nemenila po dobu minimálne troch mesiacov. Skladovanie v podmienkach pri -20 °C, viedlo k pomalému rozpadu fosforylovaných derivátov tiamínu a k zhoršenej opakovateľnosti reanalýzy.

#### 4.1.6 Aplikácia metódy na reálne vzorky

Uplatniteľnosť našej metódy sa hodnotila stanovením zmien v koncentrácii tiamínu a jeho esterifikovaných foriem, po perorálnom podaní tiamínu zdravým dobrovoľníkom. Z nameraných výsledkov, pomocou nami vyvinutej metódy, bolo možné pozorovať a monitorovať rozdiely v koncentrácii aktívnych vitamínov. Zistili sme prevládajúce zvýšenie koncentrácie Th a TMP v krvi, zatiaľ čo množstvo TDP sa znížilo. Toto zistenie môže naznačovať, že biologicky aktívna forma TDP bola použitá v metabolických procesoch, zatiaľ čo orálne podávané Th sa zatiaľ netransformovalo na aktívnu formu vitamínu a cirkulovalo v krvnom obeh. Koncentrácia P-5-P v krvi, ktorá bola závislá iba od príjmu potravy, bola vo väčšine prípadov znížená.

**Tabuľka 16** Porovnanie hodnôt pred a po podaní tiamínu

Analyt	P-5-P			TDP			TMP			Th		
	(nmol/l)			(nmol/l)			(nmol/l)			(nmol/l)		
	Pred	Po	Rozdiel	Pred	Po	Rozdiel	Pred	Po	Rozdiel	Pred	Po	Rozdiel
# 1	102,76	107,73	4,97	178,63	173,44	-5,19	17,24	19,67	2,43	24,52	48,08	2356
# 2	214,19	199,32	-14,87	176,63	159,89	-16,75	12,17	21,62	9,45	22,21	33,57	11,36
# 3	156,13	83,32	-72,81	208,00	195,75	-12,25	12,10	18,25	6,15	31,15	43,82	12,67
# 4	106,09	62,49	-43,60	183,98	159,01	-24,97	5,36	10,88	5,51	13,87	23,89	10,02
# 5	44,67	75,85	31,18	226,50	216,37	-10,13	15,42	26,19	10,76	34,30	42,53	8,24
# 6	174,89	143,24	-31,65	206,13	150,45	-55,68	17,86	21,51	3,65	30,71	44,59	13,87
# 7	69,57	53,71	-15,86	161,84	185,95	24,12	17,63	10,46	-7,17	4,03	43,19	39,16
# 8	142,02	104,71	-37,31	230,46	186,81	-43,66	23,46	19,30	-4,16	31,95	38,86	6,91
# 9	127,39	105,53	-21,87	216,41	180,86	-35,55	21,50	18,32	-3,18	26,43	49,39	22,96
# 10	214,09	142,78	-71,32	183,23	184,53	1,30	23,10	8,40	-14,70	25,96	4,42	-21,53
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> pokles po podaní </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: green; margin-right: 5px;"></div> nárast po podaní </div> </div>												

#### 4.1.7 Záver

V tejto práci bola vyvinutá a optimalizovaná nová a jednoduchá chromatografická metóda, spolu s časovo nenáročnou úpravou vzoriek. Táto metodika využíva vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu na selektívne stanovenie pyridoxal-5-fosfátu, tiamínu a jeho biologicky aktívnych derivátov, tiamín difosfátu a tiamín monofosfátu vo vzorkách krvi. Separácia látok na kolóne s povrchovo poréznymi časticami poskytla vhodné podmienky a uspokojivú retenciu na klinické monitorovanie hladín týchto vitamínov bez použitia aditív do mobilnej fázy.

Predchádzajúce chromatografické metódy stanovovali, po enzymatickej hydrolýze, iba celkový obsah tiamínu. Boli vhodné iba pre jeden vitamín a neumožnili stanovenie vitamínov v jednom cykle. Na rozdiel od predchádzajúcich metód, je táto chromatografická metóda vhodná na súčasné stanovenie P-5-P, ako aj Th a jeho fosforylovaných derivátov v krvi. Tento prístup je jednoduchý, s adekvátnou selektivitou, presnosťou a dostatočnou citlivosťou na to, aby sa mohol použiť v rutinnom klinickom laboratóriu, na hodnotenie stavu vitamínov B1 a B6 u pacientov, s podozrením na depléciu vitamínového statusu. Ďalšou výhodou, vyplývajúcou z nastavených podmienok separácie, je zvýšená stabilita analytov spolu s kvalitnejšou separáciou a zlepšeným tvarom píkov vďaka zvolenej analytickej kolóne a separácia bez nutnosti iónovo-párových činidiel.

Jednoduchá príprava vzorky pomohla prekonať problémy s viskozitou, čo tiež pomohlo reprodukovateľnosti a zvýšilo stabilitu vzorky. Aj keď analýza využíva jednoduché vybavenie, je citlivá, dostupná pre veľké množstvo klinických laboratórií, vhodná na klinické monitorovanie stavu vitamínov a na vykonávanie rutinných analýz (nízka cena analýzy, malý objem vzoriek a rozpúšťadiel) veľkých sekvencií vzoriek. Metóda využíva derivatizáciu už v procese úpravy vzorky, bez nutnosti akéhokoľvek nadštandardného prístrojového vybavenia. Validácia metódy bola vykonaná podľa doporučení smerníc na bioanalytickú validáciu EMA a FDA.

Táto metóda sa v súčasnosti používa v praxi, v rámci klinickej štúdie, na sledovanie vitamínového stavu aktívnych foriem vitamínov B1 a B6 u pacientov s predpokladom deplécie týchto vitamínov, počas liečebného procesu, na III. internej gerontometabolickej klinike Fakultnej nemocnice v Hradci Králové, v Českej Republike.



## **4.2 Systematická optimalizácia extrakcie z kvapaliny do kvapaliny, na izoláciu neznámych látok**

### **4.2.1 Úvod do problematiky a cieľ práce**

Veľmi bežnou situáciou v praxi je potreba odstrániť neidentifikované nečistoty z viaczložkového roztoku, prípadne roztoku obsahujúceho aj iné neznáme rozpustené látky, alebo oddeliť požadovanú zlúčeninu od komplexnej zmesi, ako napríklad rastlinného extraktu. Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE) je separačná technika, ktorá nachádza široké využitie v laboratórnom prostredí, ale aj v priemysle, kvôli svojej jednoduchosti, nízkej cene, vhodnosti pre tepelne labilné a vysoko prchavé zlúčeniny a jednoduchej škálovateľnosti [108, 109]. Ideálne extrakčné rozpúšťadlo by malo selektívne a účinne oddeľovať jednu alebo niekoľko látok, od zvyšných zložiek zmesi. Správne zvolené podmienky a parametre extrakcie, ako napríklad extrakčné rozpúšťadlá, činidlá, pH, alebo teplota, umožňujú koncentrovať požadované zlúčeniny a oddeliť ich od nežiadúcich látok počas jedného kroku úpravy. Jedná sa však o pomerne mnoho faktorov, ktoré musia byť zohľadňované a experimentálne optimalizované, čím sa zvyšuje časová náročnosť extrakčného postupu. Hľadanie toho najlepšieho rozpúšťadla na danú úlohu, je pri ohromnom množstve možností a ponuke rozpúšťadiel či zmesí rozpúšťadiel experimentálne vysoko nepraktické.

Systematické zlepšovanie tohoto procesu predikciou účinkov rôznych modifikácií týchto parametrov je jednou z možností, ako samotnú optimalizáciu zrýchliť. Kvôli svojej multifaktorialite sa však jedná o náročný proces. Faktoriálny dizajn experimentov je užitočný prístup optimalizácie komplexných podmienok, aj keď je pomerne náročný na čas, výpočtovú techniku a pracovnú silu [110-112].

Mnoho výpočtových chemometrických metód, napr. UNIFAC [113], MOSCED [114], LFER [115, 116], a COSMO-RS [117], môžu nahradiť experimentálne analýzy v prípadoch, ak sú extrahované zložky vzorky známe. U neznámych, alebo neidentifikovaných látok, je však systematická optimalizácia extrakcie metódou „pokus / omyl“ jedinou možnosťou. Rozdeľovaciu schopnosť látok pri extrakcii, je do istej miery možné odhadnúť aj pomocou retenčného času, pri chromatografickej analýze v reverznom móde, avšak prakticky užitočné predikcie touto metódou, je možné očakávať iba pre rozpúšťadlá podobné mobilnej fáze [118, 119].

Na určovanie distribučných koeficientov -  $\log D$  bolo vyvinutých aj niekoľko ďalších experimentálnych metodík [120-124], no aj napriek tomu sa jedná o časovo náročné postupy a pritom je ďalšie zníženie experimentálnej časovej náročnosti žiadúce.

Je známe, že rozdelenie neutrálnej rozpustenej látky medzi vodu a organické rozpúšťadlo sa dá uspokojivo opísať pomocou LFER rovnice, využívajúcej päť parametrov rozpustenej látky: deskriptory charakteru kyslosti vodíkových väzieb (HB), charakter zásaditosti vodíkových väzieb, dipolarita, polarizovateľnosť a molárny objem [125]. V prípade ionizovateľných rozpustených látok sa vyžaduje najmenej jeden ďalší deskriptor, zodpovedajúci vlastnostiam iónu. Je zrejmé, že tento princíp sa dá aplikovať aj opačne a rôzne vlastnosti rozpustených látok sa dajú odvodiť z vlastností ich rozdeľovacích / distribučných koeficientov, v rôznych pároch rozpúšťadiel [126-128]. Na základe tohto predpokladu je možné vyvodiť kvantitatívne spojitosti medzi hodnotami  $\log D$  modelových analytov v rôznych pároch rozpúšťadiel, a tie je možné použiť na predikciu distribučných vlastností neznámych zlúčenín, z relatívne malého počtu experimentálne určených hodnôt. Na rozdiel od matematických výpočtov, je experimentálne stanovenie  $\log D$  možné bez identifikácie rozpustených látok, a to aj v prípade zložitých zmesí.

Cieľom tejto práce bolo vyvinutie nových prístupov na predikciu distribúcie neznámych látok medzi dvoma kvapalinami, počas extrakcie z kvapaliny do kvapaliny. Zámerom bolo využitie experimentálnych a výpočtových prístupov analýz, ktoré sú jednoducho prístupné a cenovo nenáročné tak, aby mohli byť výsledky štúdie výhodne použiteľné na mnohé aplikácie. Hlavnou výpočtovou metódou, zvolenou pre svoju jedinečnú schopnosť predikcie vlastností viaczložkových kvapalných zmesí a neznámych rozpustných látok a rozpúšťadiel, bez dodatočných experimentálnych zásahov, bol program COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents).

Navrhované riešenie tohto problému je prediktívny model – algoritmus, ktorý sa spolieha na malé množstvo experimentálnych extrakčných údajov, ktoré je možné získať bez potreby identifikovať ktorúkoľvek z prítomných zlúčenín.

## **4.2.2 Prístrojové vybavenie, chemikálie a použitý biologický materiál**

### **4.2.2.1 Chromatografický systém**

Chromatografická analýza jednotlivých roztokov bola vykonaná v systéme na kvapalinovú chromatografiu, od firmy Agilent Technologies, v modelovej rade 1200 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Prístroj je vybavený kvartérnou pumpou 1260 Infinity G1311B, so zabudovaným degasérom a nízkotlakým gradientovým ventilom. Pumpa pracuje v rozmedzí prietokov od 0,001-5 ml pri tlaku 60MPa a od 5 – 10 ml pri tlaku 20MPa. Dávkovanie vzoriek z vialiek bolo sprostredkované pomocou štandardného autosampléru 1260 Infinity G1329B. Časť krytu autosampléru bola demontovaná a nahradená chladiacim mechanizmom, aby sa udržiavali konštantné teplotné podmienky  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , (teplota vo vnútri kompletného autosampléru sa pohybovala približne okolo  $28^{\circ}\text{C}$ ). Na udržanie stabilných podmienok počas separácie, bola kolóna umiestnená v termostate 1260 Infinity G1316A, s nastaviteľným rozmedzím, od  $10^{\circ}\text{C}$  pod okolitou teplotou do  $80^{\circ}\text{C} \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ . Na detekciu bol použitý 5 kanálový UV-Vis detektor 1260 Infinity G1365D MWD. K separácii bola použitá kolóna s reverznou fázou Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, s dĺžkou 250 mm, vnútorným priemerom 4,6 mm a plne poréznymi časticami o veľkosti 5  $\mu\text{m}$ . Na jej ochranu bola použitá identická predkolóna, s dĺžkou 12,5 mm a priemerom 4,6 mm. Celý systém bol ovládaný pomocou počítača a softvéru Agilent OpenLAB CDS, vo verzii A.01.05.

### **4.2.2.2 Laboratórne vybavenie**

K ekvilibracii podmienok roztokov v extrakčných vialkách a k homogenizácii, bolo využité orbitálne miešadlo Elpan 358S (Elpan, Katowice, Poľsko). Hodnoty pH všetkých vodných roztokov a mobilnej fázy boli merané pomocou prístroja Mettler Toledo InLab, so sklenenou pH mikroelektrodou (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA).

### **4.2.2.3 Štandardy a chemikálie**

#### ***Zložky extrakčných systémov:***

Benzylalkohol (Sigma-Aldrich, Ph. Eur., BP, NF, 99-100.5%); 1-Butanol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.5\%$ ); Chlorobenzén (Fluka,  $\geq 99.5\%$ ); Cyklohexanol (Sigma-Aldrich, 99%); Dichlórmétán (J.T. Baker,  $\geq 99.8\%$ ); Izopropylacetát (Sigma-Aldrich,

98%); n-Hexán (Sigma-Aldrich,  $\geq 97\%$ ); 1-Oktanol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ); terc-Butyl metyléter (Sigma-Aldrich, 99.8%); Toluén (Sigma-Aldrich, 99.9%). hydrogenfosforečnan sodný (Reakhim, p.a.); monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (KEBO-Lab, p.a.); kyselina chlorovodíková (Fluka, 1.0 N fixanal).

#### ***Chemické látky:***

Acetofenón (Reakhim, „čistý“); 4-Anizaldehyd (Sigma, p.a); kyselina 4-Anisová (Sigma, 98%, dar od prof. Tullia Ilometsa); Anthrachinón (Sigma-Aldrich 95%, dar od prof. Tullia Ilometsa); Katechol (Reakhim, „čistý“); Koniferyl aldehyd (Sigma-Aldrich, 98%); 1,3-Dimetoxybenzén (Aldrich,  $\geq 98\%$ ); 1,4-Dimetoxybenzén (Aldrich, 99%); Furfural (Aldrich, 99%); Kyselina gallová (Charkovský závod na chemické reagenty, „čistý“); Guaiacol (Reakhim, „čistý“); Hydrochinón (Reakhim, „najvyššia čistota“); 2'-Hydroxyacetofenón (Aldrich, 99%); kyselina 4-Hydroxybenzoová (Aldrich, 99%); 9-Hydroxyfluorén (Aldrich, 96%); 2-Izopropylfenol (ABCR, 98%); Izovanilín (Fluka,  $\geq 99.5\%$ ); 3-Metoxykatechol (Alfa Aesar, 98%); 4-Metylkatechol (Aldrich,  $\geq 95\%$ ); 3-Metylfenol (Reakhim, „čistý“); Fenol (Riedel-de-Haën, 99.5%); Pyrogallol (Sigma-Aldrich, ACS reagent); Rezorcinol (Schering-Kahlbaum AG, p. A.); Syringaldehyd (Aldrich, 98%); Kyselina syringová (Sigma,  $\geq 95\%$ ); Syringol (Aldrich, 99%); kyselina *trans*-ferulová (Aldrich, 99%); Kyselina vanilová (Fluka,  $\geq 97\%$ ); Vanilín (Alfa Aesar, 99%); 1,2-Xylén (Reakhim, „čistý“).

#### ***Chemikálie použité na prípravu mobilných fáz:***

Metanol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.9\%$  Gradient grade); Octan amónny (Fluka,  $\geq 99.0\%$ ); Mravenčan amónny (Fluka,  $\geq 99.0\%$ ); Kyselina mravčia (Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ); Kyselina octová (Fisher Scientific, USP/FCC grade).

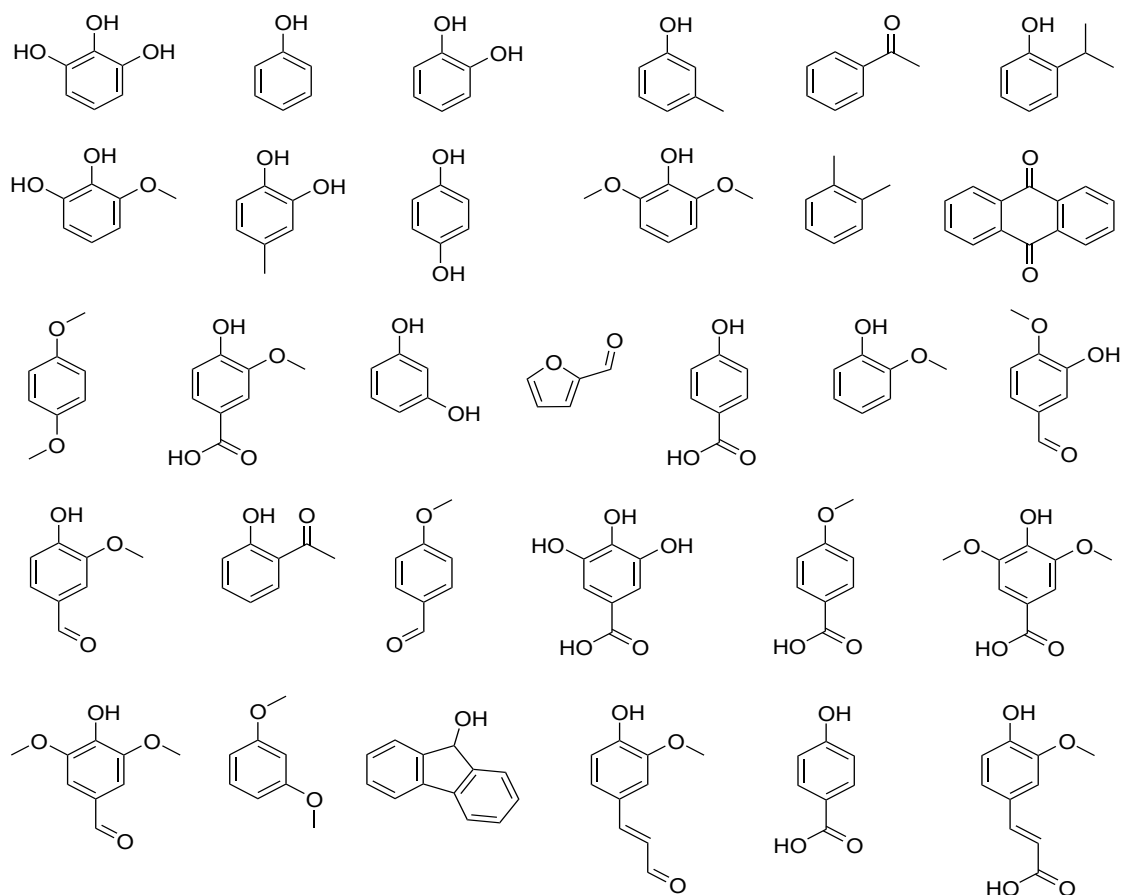
#### ***Produkty na validáciu predikčného modelu:***

Olej z Cédra Atlantského (*Cedrus atlantica*) a olej z Čiernušky siatej (*Nigella sativa*) boli zakúpené z komerčne dostupných zdrojov. Kolofónia (CAS Nr. 8050-09-7), bola zakúpená z firmy Kremer Pigmente (Kremer Pigmente GmbH & Co.KG, Aichstetten, Nemecko).

Všetky chemické látky boli použité bez dodatočnej purifikácie. Vodné roztoky boli pripravené za použitia  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  vody, generovanej zo systému Merck Millipore MilliQ, systému reverznej osmózy (Tallin, Estónsko).

#### 4.2.3 Experimentálna metódológia

Súbor skúmaných látok (Príloha V) v tejto práci, bol zložený z 30 reprezentatívnych zlúčenín, prevažne fenolických látok, bežne sa nachádzajúcich medzi produktmi depolymerizácie lignínu, vyskytujúcich sa v rastlinných extraktoch, alebo ich štruktúrne podobné látky [129-133]. Keďže lignín je jedným z najbohatších obnoviteľných materiálov na Zemi, a tiež vedľajším produktom viacerých technologických procesov, pričom lignín a jeho deriváty získavajú čoraz väčšiu pozornosť [134-137]. Lignín sa okrem paliva používa ako prekursor fenolových zlúčenín [138, 139], pri výrobe aerogélov [140, 141], živíc [142] a mnohých ďalších materiálov. Je zrejmé, že pri výrobných postupoch sa vyžadujú metódy na účinnú izoláciu, buď požadovaných zlúčenín, alebo nežiadúcich nečistôt z komplexných prírodných, alebo reakčných zmesí.



**Obrázok 21** Štruktúry látok využitých pri vývoji empirického prediktívneho modelu

Na vybrané látky boli, kvôli prístrojovým limitáciám a cenovej náročnosti ich zaobstarávania, kladené požiadavky, aby boli UV aktívne, dostatočne stabilné v roztokoch, ľahko logisticky a cenovo dostupné, a aby mali distribučné koeficienty v rozsahu použiteľnosti našej metodiky merania, teda hodnotu  $\log D$  výhodne v rozsahu  $\log D \in [-3, 3]$ .

Jednotlivé pomery distribúcie medzi dvoma nemiešateľnými fázami boli stanovené pomocou vytrepávacej metódy. Jednotlivé látky a kombinácie látok boli rozpustené, alebo jemne dispergované pomocou ultrazvuku vo vodnom roztoku, alebo organickom rozpúšťadle. V niektorých prípadoch sa hydrofóbne stanovované látky rozpustili v pomocnom rozpúšťadle (dichlórmetán, metanol), roztok sa rozdelil do prázdnych extrakčných vialiek a rozpúšťadlo sa nechalo odpariť. Pri analýze kyslých látok sa na neutralizáciu vodnej fázy použil fosfátový pufr na úpravu pH na hodnotu  $7,0 \pm 0,1$ . Organické rozpúšťadlo spolu s vodnou fázou boli zmiešané v pomere 1:1 (0,5 až 0,7 ml) priamo vo vialke s krimpovacím uzáverom. Po uzavrení nasledoval cyklus trepania počas 1,5 hodiny, pomocou orbitálnej trepačky, pri cca.  $0,58 \times g$ . Vialky boli uchytené v držiaku v penovom puzdre, v horizontálnej polohe, aby došlo k lepšiemu premiešaniu fáz. Ekvilibrácia sa uskutočnila pri laboratórnej teplote. Prípadné emulzie, vytvorené počas premiešavania, sa nechali chromatografickou analýzou stratifikovať. Vo väčšine prípadov sa celý postup - príprava roztokov, ekvilibrácia a chromatografická analýza - uskutočnili za menej ako 24 hodín, aby sa minimalizoval vplyv možných interakcií v roztokoch na výsledky analýzy.

Väčšina extrakcií bola uskutočnená s viacložkovými roztokmi, obsahujúcimi obvykle 6 až 7 analyzovaných látok, s koncentráciou 1,5 mg/ml (celková hmotnosť rozpustených látok vydelená celkovým objemom kvapalín). V niektorých prípadoch boli presné merania nemožné z dôvodu reakcií látok v roztokoch, alebo veľmi vysokých / nízkych hodnôt  $\log D$ , spôsobujúcich veľmi nízku koncentráciu rozpustenej látky v jednej z fáz. V takýchto prípadoch boli hodnoty  $\log D$  odvodené výpočtom pomocou lineárnych korelácií medzi distribučnými pomermi v rôznych pároch rozpúšťadiel.

Distribúcia rozpustenej látky medzi dvoma tekutinami bola opísaná logaritmom jej distribučného pomeru  $D$ . Jedná sa o pomer pH celkových koncentrácií všetkých foriem rozpustenej látky v organickej a vodnej fáze závislý od hodnoty pH roztoku. V situácii, keď rozpustená látka nepodlieha ionizácii, je distribučný pomer  $D$ , rovný rozdeľovaciemu koeficientu  $P$  teda  $\log P$ .

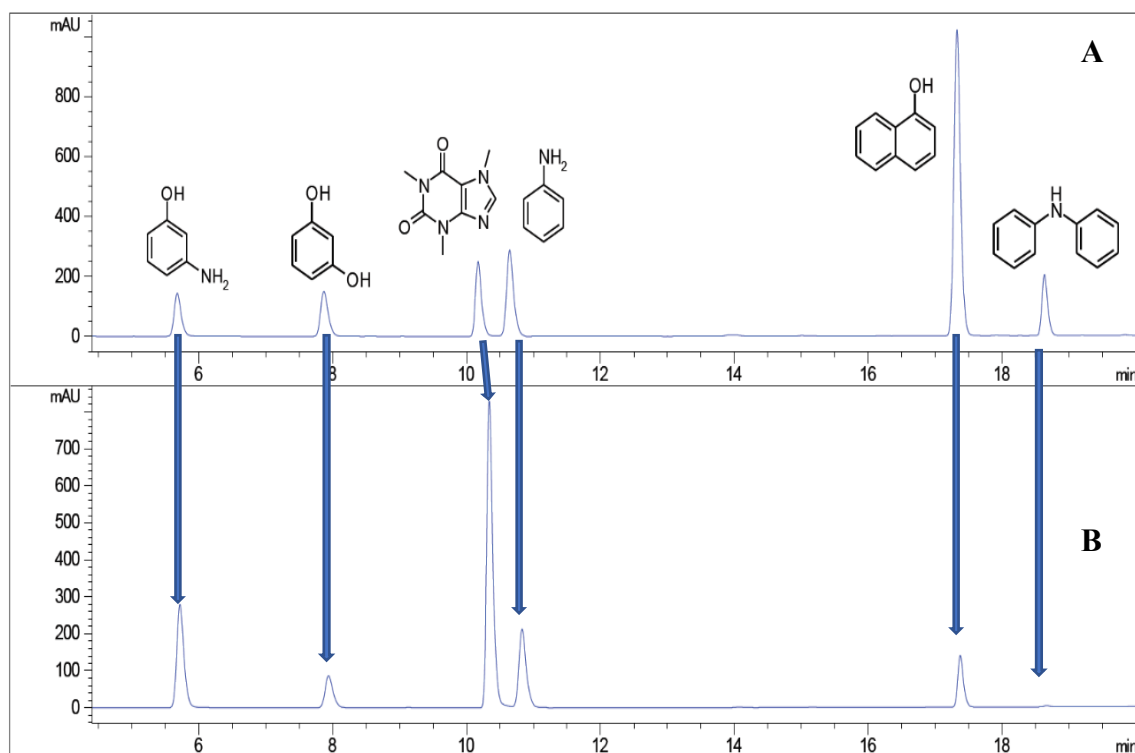
Distribučný pomer študovaných zlúčenín bol vypočítaný z pomerov plôch píkov na chromatogramoch organických a vodných fáz, meraných pri rovnakej vlnovej dĺžke, korigovaných podľa potreby pomerom dávkovaných objemov. Konečné hodnoty  $\log D$  boli vypočítané spriemerovaním výsledkov najmenej dvoch opakovaných meraní (viac v prípade zle reprodukovateľných výsledkov), uskutočnených v rôznych dňoch, s použitím rôznych kombinácií rozpustených látok v zmesi. Zlúčeniny, ktoré sa ukázali ako problematické, sa analyzovali samostatne, alebo dodatočne k analýze v zmesiach s viacerými rozpúšťadlami.

#### 4.2.4 Chromatografická analýza

V každej chromatografickej analýze boli optimalizované podmienky tak, aby vyhovovali rôznemu zloženiu analyzovaných roztokov. Cieľom optimalizácie podmienok bolo dosiahnutie adekvátneho rozlíšenia medzi jednotlivými analytmi pomocou zmeny podmienok gradientu. Rovnaké podmienky boli následne aplikované pri analýze oboch kvapalných fáz. Zloženie mobilnej fázy bolo vo všetkých vzorkách rovnaké. Mobilná fáza sa podľa vlastností stanovovaných analytov skladala z dvoch pufrův:

- a) 10 mM octanového pufru o pH 4,8,
- b) 1 mM mravenčanového pufru upraveného na pH 2,8.

Zvolené množstvo nástreku záviselo od rozpúšťadla vzoriek. Zohľadňovalo sa pri tom, aby nedochádzalo k interferencii medzi analytmi a samotným rozpúšťadlom a k poklesu separečnej účinnosti. Vo väčšine prípadov sa na UV-Vis detekciu použili nasledujúce vlnové dĺžky (nm): 220, 245, 254, 274 a 280. Výber vlnovej dĺžky pre integráciu jednotlivých píkův rozpustenej látky a následný výpočet hodnôt  $\log D$  bol podmienený príslušnými absorbanciami látok a nečistôt separovaných s nimi, ale aj kvalitou základnej línie pri jednotlivých vlnových dĺžkach. Kalibrácia nebola považovaná za potrebnú, pokiaľ obe analyzované fázy boli merané pomocou rovnakej chromatografickej metódy a v krátkom časovom úseku.



**Obrázok 22** Chromatogram ekvilibrovanej organickej (butanol, vrchný chromatogram - **A**) a vodnej (fosfátový pufor pH 7, spodný chromatogram - **B**) fázy, po extrakcii viacložkového roztoku  
 Šípky označujú korešpondujúce látky a ich píky



## 4.2.5 Optimalizácia experimentálnych podmienok

### 4.2.5.1 Optimalizácia pH vodných roztokov

Prítomnosť kyslých zlúčenín vo vodnej fáze môže zmeniť hodnotu pH, a tým ovplyvniť distribučnú rovnováhu samotnej rozpustenej látky a ďalších zlúčenín v roztoku. Predpokladá sa, že v prípade kyslej vodnej fázy (0,1 M HCl) je disociácia kyslých látok, rozpustených v roztoku, úplne potlačená a koncentrácia 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkovej poskytuje dostatočnú pufrovaciu kapacitu na to, aby sa vplyv kyslých látok vo vodnej fáze na pH vodnej fázy predpokladal za zanedbateľný. Pri štúdiu kyslých látok v neutrálnych vodných fázach sa pH, vo väčšine prípadov, upravilo na hodnotu  $7,0 \pm 0,1$ , pridaním potrebného množstva hydrogenfosforečnanu sodného k roztoku požadovaných zlúčenín v deionizovanej vode. Dôvodom prídavku priamo do vodnej fázy bol fakt, aby sa množstvo fosfátov v roztoku udržiavalo na minime, a aby sa minimalizovali možné špecifické interakcie fosfátov s rozpustenými látkami. V prípade merania látok citlivých na pH sa hodnota pH vodnej fázy kontrolovala aj po extrakcii. Ak sa zistilo, že je hodnota pH výrazne odlišná od neutrálnej hodnoty, boli namerané hodnoty  $\log D$  kyslých analytov korigované podľa vzorca:

$$\log D = \log D(\text{namerané}) + \log \left( \frac{1 + 10^{pH(\text{aktuálne})} - pK_a}{1 + 10^{pH(\text{teoretické})} - pK_a} \right)$$

V niektorých prípadoch došlo k zisteniu, že postup na stabilizáciu pH pomocou pufru bol nedostatočný a došlo ku kolísaniu pH až o 0,6 jednotiek. V takýchto prípadoch sa ako vodná fáza použil 20-80 mM fosfátový pufr (hydrogénfosforečnan sodný a monohydrát dihydrogénfosforečnanu sodného v molárnom pomere 39:61). Pufrovanie sa nepovažovalo za potrebné v prípadoch, keď boli v roztoku prítomné iba neutrálne zlúčeniny (ionizované iba v zanedbateľnej miere pri pH 7, s  $pK_a \geq 9$ ).

Zistilo sa taktiež, že prítomnosť organického rozpúšťadla vo vodnej fáze pri saturačnej hladine ovplyvňuje výsledok merania pH so sklenenou elektródou, čím sa hodnota zvyšuje až o 0,1 jednotky pH, v závislosti od rozpustnosti organického rozpúšťadla vo vode. Bolo to zohľadňované pri meraní a korekcii hodnôt pH. Tento jav však zvyšuje neistotu pri meraní pH, takže korekcie pH môžu byť menej efektívne a spoľahlivé.

#### 4.2.5.2 Dĺžka ekvibrácie

Na ustálenie distribúcie analyzovaných látok, bolo nutné stanoviť dĺžku ekvibrácie. Aj napriek všeobecným doporučeniam [118, 143, 144], ktoré odporúčajú saturáciu jednotlivých kvapalných fáz navzájom, bolo pre účely nášho experimentu, zvolené nenasýtiť danú organickú a vodnú fázu. Dôvodom nenasýtenia bolo veľké množstvo párov rozpúšťadiel a látok, ktoré boli v tejto práci stanovované. Na rozdiel od iných metód, používaných k stanovovaniu distribučného koeficientu [144], zmena v relatívnych objemoch oboch fáz nemá zásadný vplyv na chybu merania v tejto metodológii. Preto bola zvolená dlhšia doba ekvibrácie, aby sa zaistilo, že obe rozpúšťadlá, a látky v nich rozpustené, dosiahnu rovnovážny stav. Dostatočnosť samotného intervalu ekvibrácie bola validovaná sériou experimentov. Pri týchto experimentoch bolo pripravených 5 identických vialiek, ktoré obsahovali 0.6 ml bezvodého oktanolu a roztoku 6 študovaných látok v 0.1 M kyseline chlorovodíkovej. Jednotlivé vialky boli agitované v časovom intervale od 0,5 hodiny do 2,5 hodiny a následne bola vykonaná chromatografická analýza. Všetky vzorky boli analyzované dvakrát. Prvé meranie bolo vykonané do 30 minút po agitácii. Druhé meranie bolo zopakované po siedmich hodinách od agitácie. Výsledky sú prezentované v Tabuľke 17.

**Tabuľka 17** Vplyv dĺžky agitácie a času medzi agitáciou a chromatografickou analýzou, na výsledok merania

Látka	Čas medzi koncom agitácie a začiatkom analýzy									
	0,5h					~7 h				
	Dĺžka agitácie (h)									
	0,5	1	1,5	2	2,5	0,5	1	1,5	2	2,5
Rezorcinol	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
Katechol	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89
Vanilín	1,21	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22
Fenol	1,49	1,50	1,51	1,50	1,50	1,51	1,50	1,50	1,50	1,51
p-anisaldehyd	1,56	1,57	1,57	1,57	1,57	1,56	1,56	1,57	1,56	1,56

Výsledky sú prezentované ako hodnoty  $\log P$  (oktanol/voda)

Výsledky demonštrujú, že pre dané testované látky bol dosiahnutý rovnovážny stav už počas prvých 30 minút agitácie, čo koreluje s publikovanými výsledkami v iných prácach [145]. Rovnako ani interval medzi koncom agitácie a analýzou nemal štatisticky

významný vplyv na výsledok analýzy. Z predošlých experimentov vyplynulo, že pre mierne hydrofilné, alebo hydrofóbne látky (s absolútnou hodnotou  $\log D < 0,8$ ), bolo ekvilibrium dosiahnuté už po 15 minútach, vo všetkých pároch rozpúšťadiel. Silne hydrofóbne látky by mohli potrebovať dlhší čas agitácie, aby došlo k ich termodynamickej distribúcii medzi dve kvapaliny. Z toho dôvodu bol zvolený 90 minútový agitačný program. Tento interval bol dostatočným na ustálenie distribúcie vo všetkých, nami testovaných látkach.

#### 4.2.5.3 Teplotné podmienky

Teplotné podmienky, počas výkonu experimentálnej práce, boli závislé od ambientných podmienok laboratória a boli v rozsahu 20-24 °C. Teplota spracovaných vzoriek uložených v autosampleri chromatografu bola v rozsahu 23 – 27 °C. Efekt zvýšenej teploty prístroja na stabilitu rozdelenia analytov sa, však, nepokladal za výrazný. Ovpływňovanie výsledných hodnôt bolo, z dôvodu neprítomnosti agitácie a relatívne rýchlej doby, počas ktorej boli vzorky analyzované, relatívne malé, čím bol faktor teploty na zmenu distribúcie minimalizovaný. Podľa dostupnej literatúry [146-149] sa efekt teploty na výslednú hodnotu rozdeľovacieho/ distribučného ekvilibria pohybuje v rozsahu  $\pm 10^{-2} - 10^{-3} \log P / ^\circ\text{C}$ , v závislosti od použitých párov rozpúšťadiel. V prípade kyslých analytov má teplota vplyv aj na hodnotu ich  $\text{pK}_a$ , ktoré ovplyvňuje distribučný koeficient. Tento účinok však nie je natoľko silný, aby závažným spôsobom ovplyvnil výslednú hodnotu  $\log D$ . Podľa literárnych zdrojov má zmena teploty z 20 na 30 °C vplyv na hodnotu distribučnej konštanty v rozsahu 0,01 – 0,02 jednotky [150].

#### 4.2.5.4 Interakcie medzi stanovovanými látkami

Väčšina analýz bola vykonávaná vo viaczložkových zmesiach. V prevažnej väčšine experimentov (s výnimkou látok popísaných nižšie), bolo možné relatívne presne popísať hodnotu rozdeľovacích koeficientov. Výsledky buď odpovedali nameraným a vypočítaným hodnotám, alebo bola u nich pozorovaná výborná lineárna korelácia s predpokladanou hodnotou. Hlavným problémom tohoto prístupu sú možné interakcie medzi stanovovanými látkami. Počas experimentov boli pozorované dva hlavné typy interakcií: interakcia rozpúšťadla s rozpustenou látkou (vrátane nečistôt v rozpúšťadlách a rozpustených látkach) a interakcie nezahŕňajúce chemickú transformáciu, ktoré však majú vplyv na distribučnú rovnováhu.

Prvý typ je možné pomerne jednoducho rozoznať, výskytom nových píkov na chromatograme a možnou zmenou v sfarbení roztokov. Pravdepodobnou príčinou je potenciácia, alebo inhibícia účinku kyseliny na reakcie v roztoku, ako oxidácia / rozklad látok, alebo reakcie medzi nečistotami vo vzorke a rozpúšťadlách. V takýchto prípadoch boli výsledné hodnoty  $\log D$  interpolované z lineárnych korelácií. V niekoľkých prípadoch sa stanovovaná látka javila ako nekompatibilná, s niektorými používanými rozpúšťadlami (reprodukovateľnosť výsledkov bola nízka v oboch kvapalných fázach), čo znemožnilo použitie tejto experimentálnej metódy.



**Obrázok 20** Príklad interakcie jednej látky v rôznych rozpúšťadlách

Ďalší typ je možné odhaliť až pri porovnávaní výsledkov rôznych kombinácií látok, alebo látok samotných, v analyzovanej zmesi. Podstata týchto nereaktívnych interakcií je, pravdepodobne, elektrostatického pôvodu (iónové párovanie, alebo špecifické vodíkové väzby). Vypočítané hodnoty  $\log D$  jednotlivých látok v zmesiach sa, výsledkom tohto efektu, môžu signifikantne odlišovať (ako to bolo pozorované na výsledkoch medzidennej reprodukovateľnosti), v závislosti od charakteru a rozsahu interakcií v rozdielnych zmesiach. Na kompenzáciu týchto interakcií boli merania opakované minimálne v piatich pokusoch, s rôznou kompozíciou látok, rovnako aj v monokomponentnom roztoku. Snažili sme sa zachovať koncentráciu analytov na najnižšej možnej hranici tak, aby nedošlo k ovplyvneniu presnosti analýzy. Publikované dáta [145] ukazujú, že fluktuácie koncentrácií o  $\pm 50\%$  nemajú žiaden systematický efekt na distribúciu látok, v rozmedzí koncentrácií používaných v tejto práci. Existujú aj dôkazy o asociačných procesoch pri týchto látkach (pravdepodobne dimerizácia) v monokomponentných roztokoch, nami študovaných karboxylových kyselín, ktoré sa viac prejavovali v kyslom prostredí vodnej fázy.

#### 4.2.6 Výsledky a diskusia

Hodnota distribučného koeficientu neznámej látky, môže byť pre daný pár rozpúšťadiel odvodená na základe hodnôt  $\log D$ , v iných pároch rozpúšťadiel a pomocou lineárnej regresie dopočítaná. Znižuje sa tým množstvo experimentálnej práce na meranie minimálneho počtu referenčných párov rozpúšťadiel. Experimentálna metodológia, použitá pri zisťovaní distribučných pomerov v tejto práci, je rýchlo aplikovateľná aj v praktických situáciách, pri analýze komplexných, viacložkových zmesí, bez akýchkoľvek štrukturálnych informácií o obsahových látkach.

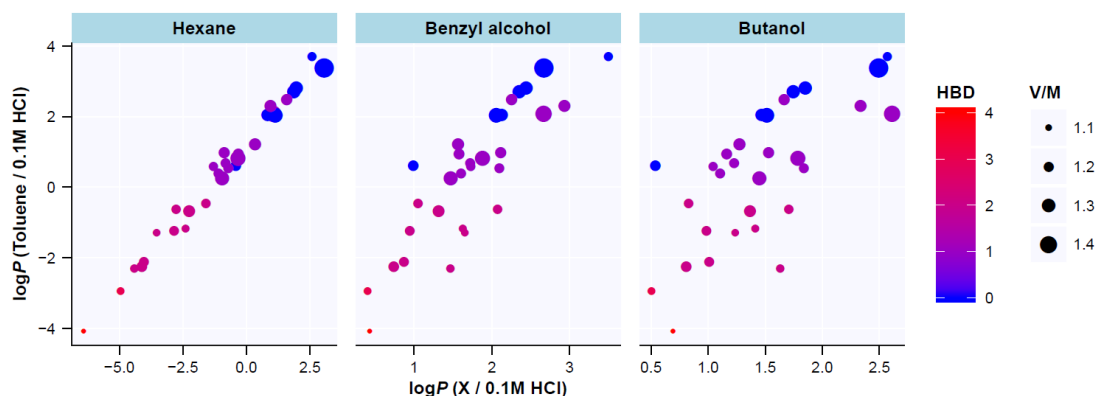
Na vývoj prediktívneho modelu bolo vybraných 30 látok neutrálneho, alebo mierne kyslého charakteru. Vzhľadom na predošlé skúsenosti laboratória, ktoré naznačovali, že vysoká diverzita látok znižuje presnosť prediktívneho modelu a zameranie výskumnej skupiny na látky prírodného pôvodu, bola zvolená skupina látok podobných lignínu. Jedná sa o produkty rozkladu lignínu a ich štruktúrne podobné molekuly. Využitie lignínu a jeho derivátov, ako hojnej biologicky obnoviteľnej suroviny v posledných rokoch naberá na popularite [134, 137].

Na LLE extrakciu bolo použitých 10 organických rozpúšťadiel reprezentujúcich širokú škálu s rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami: n-hexán, toluén, chlórbenzén, dichlórmetán (DCM), metyl terc-butyl éter (MTBE), izopropyl acetát, benzylalkohol, cyklohexanol, n-butanol a n-oktanol. Rozpúšťadlá boli kombinované s dvoma druhmi vodných fáz – neutrálnou a kyslou vodnou fázou. Zásaditá vodná fáza, aj napriek potenciálnej užitočnosti na separáciu slabo kyslých zlúčenín od neionizovateľných látok, sa ukázala ako problematická z praktického hľadiska.

Hodnoty  $\log P$  a  $\log D$  pri 30 rozpustených látkach v 20 pároch rozpúšťadiel sa stanovili experimentálne, alebo pri problematických prípadoch boli odhadnuté a korigované, na základe zvyšných experimentálnych údajov. Vyvinutý predikčný prístup je založený na multilineárnej regresii. Najprv bolo vybraných  $N$  referenčných párov rozpúšťadiel, v ktorých sa experimentálne študovali neznáme rozpustené látky. Potom sa pomocou týchto cvičných dát vytvorili multilineárne rovnice na spojenie  $\log D$  hodnôt rozpustených látok v referenčných dvojiciach rozpúšťadiel. Matematický model má túto podobu:

$$\log D(X) = a_x + \sum_{i=1}^N \{\rho_X(RSP_i) \times \log D(RSP_i)\}$$

kde  $X$  označuje, v ktorých pároch rozpúšťadiel sa má predpovedať hodnota  $\log D$  rozpustenej látky,  $RSP_i$  je  $i$ -tý referenčný pár rozpúšťadiel,  $a_x$  a  $\rho_x$  sú modelové parametre. Jeden je konštantný koeficient  $a$ . Pre každý pár rozpúšťadiel ( $X$ ) je  $N$  koeficientov  $\rho$ .



**Obrázok 21** Interakcie medzi hodnotami  $\log P$  (toluén / 0,1 M HCl) a  $\log P$  v troch ďalších pároch rozpúšťadiel ( $X$ )

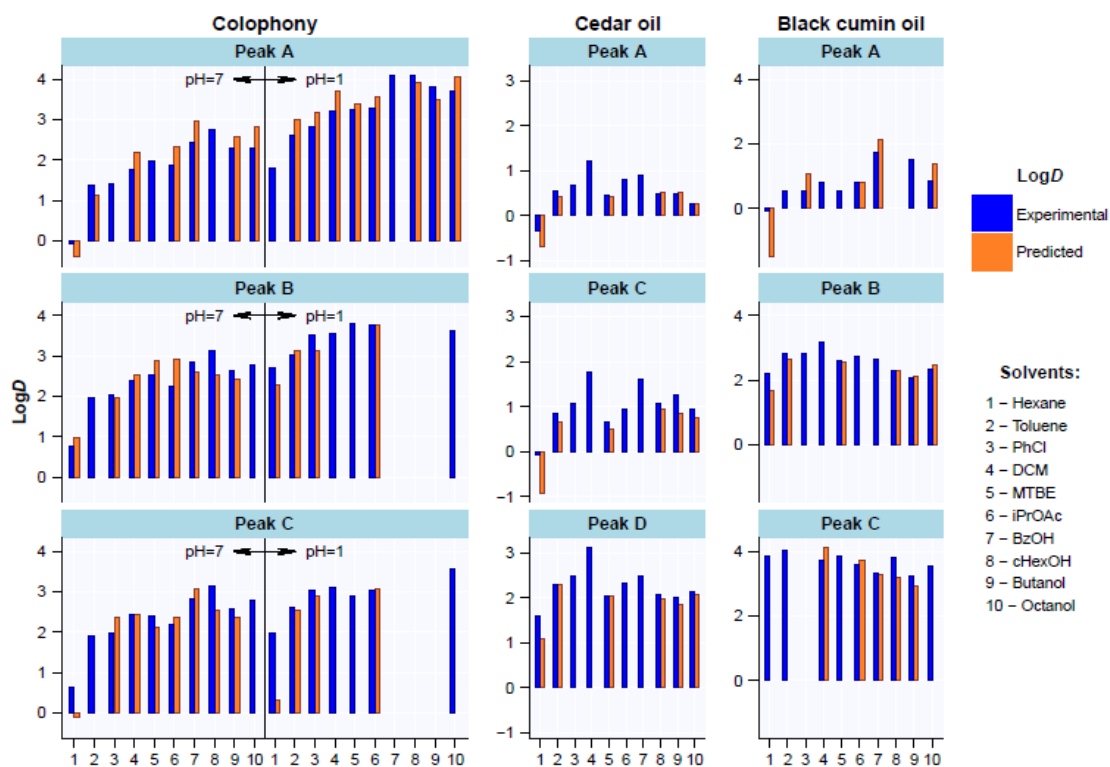
Vzťahy medzi hodnotou  $\log P$  (toluén / 0,1 M roztok HCl) a hodnotami  $\log P$  v ďalších troch pároch rozpúšťadiel ( $X$ ). Farba údajov: body zodpovedajú počtu vodíkových väzobných donorových skupín (HBD) v molekule rozpustenej látky; veľkosť bodov odráža špecifický objem rozpustenej látky vyjadrenú v  $\text{\AA}^3/\text{amu}^{-1}$  ( $V/M$ ).

S rastúcimi rozdielmi medzi rozpúšťadlami sa zvyšuje komplexnosť interakcií. Rôzne schopnosti rozpúšťadiel, kvôli  $\pi - \pi$  interakciám a vodíkovým väzbám spôsobujú rozdiely v zodpovedajúcich vlastnostiach rozpustených látok. Farba dátových bodov na grafe zodpovedá počtu vodíkových väzieb donorových skupín v molekule rozpustenej látky, zatiaľ čo veľkosť odráža približnú polarizovateľnosť rozpustenej látky vyjadrenú ako pomer molekulového objemu v  $\text{\AA}^3$  k molárnej hmotnosti v g/mol.

Namerané dáta potom môžu byť pred zostavením prediktívneho modelu upravené, napríklad je možné vylúčiť nevhodné dvojice rozpúšťadiel a zlúčeniny, o ktorých je známe alebo sa predpokladá, že sa podstatne líšia od cieľovej rozpustenej látky. Internou validáciou (vynechanie jedného bodu a jeho následná rekalkulácia – tzv. leave one out LOO) sa preukázal dobrý výkon prediktívneho algoritmu v podmienkach, kde vlastnosti párov rozpúšťadiel neboli ovplyvňované rozpustenými látkami (vo vzorkách s malým množstvom analyzovaných látok). Minimálny počet referenčných párov rozpúšťadiel potrebných na rekalkuláciu bol tiež optimalizovaný v testoch LOO a nastavený na 4 v prípade neionizovateľných rozpustených látok a 5 v prípade kyslých rozpustených látok. Stredná kvadratická odchýlka (RMSE) predikcií v LOO teste zahŕňajúcom úplnú tréningovú sadu a 5 referenčných párov rozpúšťadiel bola 0,16 logaritmických jednotiek. Na porovnanie, presnosť experimentálnych údajov bola stredná kvadratická odchýlka

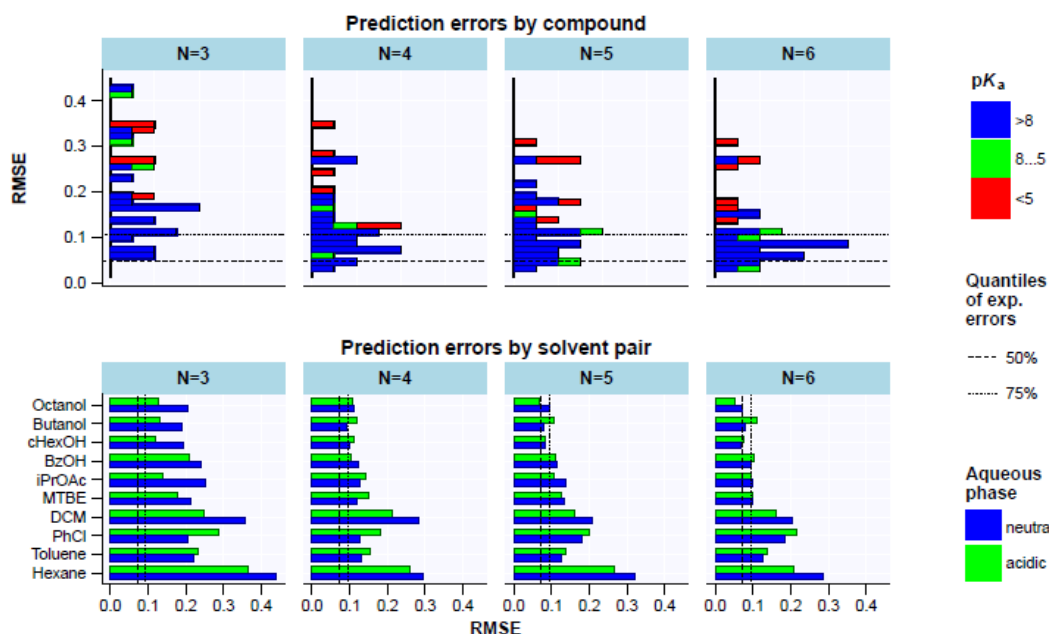
vyhodnotená na 0,08 logaritmických jednotiek. Najvhodnejší pár rozpúšťadiel k separácii náhodných, neznámych párov zlúčenín v experimentálnej sade, bol správne identifikovaný v 60% prípadov a bol medzi predpokladanými tromi najlepšimi v 90% prípadov.

Externá validácia prediktívneho modelu pomocou relatívne koncentrovaných a multikomponentných roztokov prírodných produktov (cédrový olej, olej z Černušky siatej a kolofónia) odhalila, že v prípadoch, keď nie je vplyv rozpustených látok na vlastnosti použitých rozpúšťadiel zanedbateľný, môžu byť predpovede hodnôt  $\log D$  významne skreslené. Najväčšie chyby predpovede boli pozorované v prípade hexánu - najmenej polárneho použitého organického rozpúšťadla, a teda najcitlivejšieho na účinok polárnych látok v zmesi. Ako je znázornené na Obrázku 22, predpovedané hodnoty  $\log D$  v sústave hexán / voda sú oveľa nižšie ako experimentálne hodnoty, pravdepodobne preto, že prítomnosť ostatných zložiek zmesi v organickej fáze významne zvyšuje jej polaritu, a teda afinitu k polárnejším rozpúšťadlám. Preto sú polárnejšie rozpúšťadlá k tomuto účinku oveľa menej citlivé, takže chyby v predikcii sú oveľa menšie. Experimentálne sa tiež potvrdilo, že silne polárne látky sú viac ovplyvnené „cudzími“ zložkami v rozpúšťadlových systémoch, než látky menej polárne.



**Obrázok 22** Výkonnosť modelu s niektorými neidentifikovanými zložkami kolofónie, oleja z Černušky siatej a cédrového oleja

Vybrané zložky cédrového oleja a oleja z Čerňušky siatej, vykazovali v podstate rovnaké hodnoty logD v neutrálnej a kyslej vodnej fáze, takže na predikciu bola využitá iba polovica tréningovej sady a 4 vstupné namerané hodnoty. Tri vybrané zložky kolofónie boli kyslého charakteru a ich rozdelenie bolo závislé na pH, preto bola použitá kompletná experimentálna sada a 5 vstupných hodnôt.



**Obrázok 23** Distribúcia strednej kvadratickej odchýlky (RMSE) v LOO testoch, ako funkcia počtu vstupných hodnôt logD/logP (N), kyslosti (pKa) zlúčenín a párov rozpúšťadiel

Výsledky ukazujú, že dobrú predikciu je možné dosiahnuť už pri 4 vstupných hodnotách. Extrakčné správanie silne kyslých zlúčenín sa predpovedá menej presne, ako správanie neionizovateľných alebo slabokyslých zlúčenín, čo môže byť spôsobené buď nedostatočným zastúpením karboxylových kyselín v experimentálnej sade, alebo o niečo nižšou kvalitou zodpovedajúcich experimentálnych hodnôt. Kvalita predikcie sa tiež líši medzi pármami rozpúšťadiel.

Presnosť absolútnych predpovedí hodnôt  $\log P$  /  $\log D$  je nižšia, ako výsledky validácie ( kde validácia RMSE bola približne 0,4 logaritmických jednotiek), čo môže byť čiastočne spôsobené experimentálnym prístupom a preanalytickými zásahmi, ktoré vedú k menej spoľahlivým experimentálnym údajom. Vzory správania pri extrakcii rozpustených látok sa však reprodukovajú dostatočne dobre, aby pomohli pri riešení praktických problémov. Ako sa ukázalo, v priebehu externej validácie, kde sa očakávalo, že presnosť prediktívneho modelu na reálnych vzorkách bude nižšia (RMSE 0,3 - 0,5 logaritmických jednotiek), napriek tomu poskytuje užitočné kvalitatívne alebo



semikvantitatívne predpovede a umožňuje znížiť množstvo experimentálnej práce, potrebnej na optimalizáciu procesu.

#### 4.2.7 Záver

Cieľom tejto práce bolo, vyvinúť nové prístupy pre modelovanie intramolekulárnych interakcií látok vo vodných roztokoch počas extrakčného postupu z kvapaliny do kvapaliny a ich výsledné distribučné vlastnosti. Ďalším cieľom, uvádzaným v tejto práci, okrem predikcie vlastností založených na konvenčných štruktúrach, bola možnosť predpovedať rozdelenie počas LLE u rozpustených látok s neznámou štruktúrou.

Došlo k vyvinutiu empirického predikčného modelu na odhadovanie výsledku LLE pre zlúčeniny s neznámymi štruktúrnymi vlastnosťami. Model založený na multilinéarnej regresii, vyžaduje len málo experimentálne získaných hodnôt  $\log D$  analyzovanej látky v rôznych pároch rozpúšťadiel, ako vstupov na predpovedanie hodnôt  $\log D$  v ďalších pároch rozpúšťadiel. Bola vypracovaná experimentálna metodika na určovanie hodnôt  $\log D$  neidentifikovaných komponentov spolu s nevyhnutnými postupmi spracovania údajov a odhadu neistoty. Experimentálna metóda - extrakcia vo vialke, nasledovaná analýzou HPLC - je robustná a používa tradičné laboratórne vybavenie.

Kvalita predpovede pomocou empirického modelu sa menila v závislosti od rozsahu interakcií medzi látkami a rozpúšťadlom (hlavne v menej polárnej organickej fáze), ale užitočné odhady distribučného koeficientu sa získali aj vtedy, keď nebola dosiahnutá kvantitatívna presnosť. Stredná kvadratická hodnota chyby predikcie kolísala od  $<0,2$  logaritmickej jednotiek po  $0,5$  logaritmickej jednotiek.

Nakoniec sa experimentálne údaje o rozdelení / distribúcii, získané v priebehu práce, použili na vyhodnotenie kvality predpovedí COSMO-RS pre rôzne páry rozpúšťadiel a typy rozpustených látok. Bola hodnotená celková kvalita predikcie a presnosť vypočítaných stredných parametrov. Celková predikcia RMSE  $\log P$  bola  $0,6$  logaritmickej jednotky, ktorá sa pohybovala od  $0,2$  do  $0,7$  pre rôzne páry rozpúšťadiel. Presnosť predpovedí  $\log D$  bola očakávaná nižšia, kvôli nedokonalosti predpovede  $pK_a$  a komplexnému správaniu iónov v dvojfázových systémoch. Identifikovali sa problematické riešenia a v každom prípade sa navrhli dôvody presnosti predikcie podhodnotenia. Z vytvorených algoritmov bol nakoniec vyvinutý program, ktorý je možné používať k predikcii a izolácii neznámych látok v multikomponentných vzorkách.

## 4.3 Vývoj metódy na screening alkaloidov v extraktoch prírodného pôvodu

### 4.3.1 Úvod do problematiky a cieľ práce

Rastliny produkujú veľké množstvo sekundárnych metabolitov. Ako sekundárne metabolity označujeme látky, ktoré sa nezúčastňujú základných metabolických pochodov bunky (primárny metabolizmus), ale sú z týchto látok vytvárané. Môžu to byť rôzne obranné látky, signálne molekuly, pigmenty, stavebné molekuly, ktoré vytvárajú skelet pre organizmus a podobne. Podľa spôsobu ich biosyntézy, rozdeľujeme rastlinné sekundárne metabolity na tri hlavné skupiny: izoprenoidy, fenolické látky (naftochinóny, flavonoidy, ligníny) a alkaloidy. Z mnohých tried prirodzene sa vyskytujúcich organických zlúčenín, v súvislosti s ich zaujímavými biologickými vlastnosťami, je v poslednom období veľký záujem práve o alkaloidy. Alkaloidy vo svojej štruktúre obsahujú atóm alebo atómy dusíka. Tieto atómy dusíka sa môžu pri acidobázických reakciách správať ako báza. Reagujú s kyselinami a sú schopné vytvárať soli, rovnako ako anorganické zásady, preto je názov alkaloidov odvodený z latinského slova „alkali“, teda zásada. Všeobecne alkaloidy, ktoré sa považujú za amíny, rovnako ako amíny v ich názvoch, majú príponu -ín. Biosyntéza týchto látok vychádza z aminokyselín [151].

Podľa prekursoru biosyntézy možno alkaloidy rozdeliť na:

- 1) alkaloidy odvodené od fenylalanínu a tyrozínu
  - (protoalkaloidy - v ktorých dusík nie je súčasťou heterocyklu, izochinolinové alkaloidy),
- 2) alkaloidy odvodené od tryptofánu
  - (indolové alkaloidy, chinolínové alkaloidy),
- 3) alkaloidy odvodené od histidínu
  - (imidazolové alkaloidy),
- 4) alkaloidy odvodené od ornithínu a lyzínu
  - (pyridínové, piperidínové, chinolizidínové, tropánové alkaloidy),
- 5) pseudoalkaloidy
  - ktorých biosyntéza nevychádza z aminokyselín, avšak dusík je súčasťou cyklu (terpenické alkaloidy, steroidné alkaloidy).

Alkaloidy sú druho vo špecifické. Medzi najvýznamnejšie rastlinné čeľade, produkujúce alkaloidy patrí: Apocynaceae, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae a Solanaceae. Alkaloidy sú prítomné aj v niektorých živočíšnych druhoch, ako sú žaby (pralesničky rodu

*Phyllobates*), severoamerický bobor (*Castor canadensis*) a niektorých druhoch jašteríc, ale produkujú ich aj huby a paličkovce. Po tisíce rokov, sa výťažky z rastlín obsahujúcich alkaloidy používali ako liečivá a za svoje silné účinky vďaka prítomnosti alkaloidov [152].

Alkaloidy majú rôzne fyziologické účinky: antibakteriálne, antimitotické, antifungálne, protizápalové, analgetické, lokálne anestetické, neurofarmakologické, hypnotické, psychotropné a protinádorové. Viaceré z nich sa dnes využívajú vo farmaceutickom priemysle. Napríklad, alkaloid galantamín, izolovaný z rastlín čeľade Amaryllidaceae, ktorý sa využíva v terapii neurodegeneratívneho ochorenia - Alzheimerovej choroby. Alebo indolové alkaloidy vinkamín a vinblastín z *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), ktoré našli uplatnenie v liečbe nádorových ochorení a veľa ďalších látok. V dnešnej dobe sú alkaloidy stále vo veľkom záujme organických chemikov, biológov, biochemikov, farmakológov a farmaceutov. Sú dôležitými zlúčeninami v organickej syntéze pri hľadaní nových polosyntetických a syntetických derivátov s lepšou biologickou aktivitou ako pôvodné zlúčeniny [153].

Pre biologické testy a konformačnú analýzu zohráva analytická a preparatívna chromatografia zásadnú úlohu pri určovaní a purifikácii týchto látok.

Cieľom tejto práce bolo vyvinutie metódy a optimalizácia podmienok detekcie tak, aby bolo možné analyzovať vzorky alkaloidných extraktov a účinne separovať interferujúce látky od skúmaných alkaloidov. Dôležitým faktorom bola aj možnosť jednoducho preniesť dané podmienky separácie aj na preparatívny systém, aby bolo možné v prípade, že by sa vo finálnej vzorke nachádzali nežiadúce komponenty, ich spoľahlivo odstrániť.

#### **4.3.2 Prístrojové vybavenie a chemikálie**

##### **4.3.2.1 Chromatografický systém**

K chromatografickej analýze bol použitý prístroj na preparatívnu / analytickú kvapalinovú chromatografiu, od firmy Waters (Waters Corporation, Milford, USA). Kvapalinový chromatograf pozostával z automatického dávkovača vzoriek spojeného s kolektorom frakcií Waters Sample Manager 2767, s voľbou nástreku v rozsahu 1 - 20 µl, vybaveného aj 1 ml, 5 ml a 10 ml injekčnou slučkou. Súčasťou prístroja bol kolónový selektor System Fluidics Organizer s možnosťou prepínania medzi 3 analytickými a 3 preparatívnymi kolónami, binárna gradientová pumpa Waters 2545, ktorá operuje

v rozsahu 0,5 až 150 ml/min a maximálnym tlakom 42MPa. K detekcii prístroj využíva detektor s diódovým poľom Waters 2998, so zberom absorbancie v rozsahu od 190 do 800 nm a hmotnostný spektrometer Waters Acquity qDa, schopný zberu dát v rozsahu od 30 do 1250 m/z, pri rýchlosti až do 20 Hz s elektro-sprejovou ionizáciou. V preparatívnom režime sú zaradené aj dve pumpy Waters 515 zapojené do deliča prietoku Waters flow splitter, ktoré delili eluát z kolóny v pomere 1000:1 do qDa detektora. Jednotlivé extrakty a štandardné látky boli analyzované pri laboratórnej teplote.

Na konfirmáciu prchavých stanovovaných látok bol využitý aj plynový chromatograf s hmotnostnou detekciou od firmy Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). GC-EI-MS systém pozostával z plynového chromatografu Agilent 7890A a hmotnostného detektora Agilent 5975C MSD, pracujúcom v režime elektrónovej ionizácie pri 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Na analýzu bola použitá kolóna HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent Technologies, USA). Zvolený teplotný gradient začínal od 100 do 180 °C po 15 °C/min, po ktorom nasledovala 1 minúta pri 180 °C a následne gradient od 180 do 300 °C po 5 °C/min, nasledovanom 5 minútami pri 300 °C. Detekčný rozsah bol nastavený na m/z 40 – 600 m/z. Teplota injektora bola nastavená na 280 °C. Prietok nosného plynu (hélium) bol 0,8 ml/min. K analýze bol použitý tzv. split liner s deliacim pomerom 1:15.

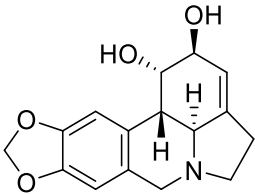
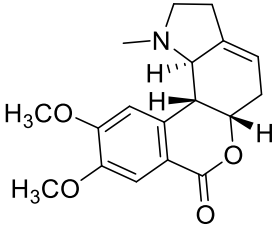
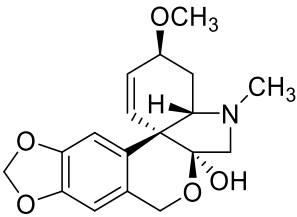
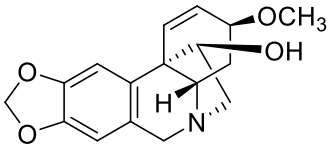
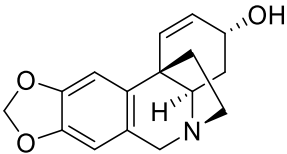
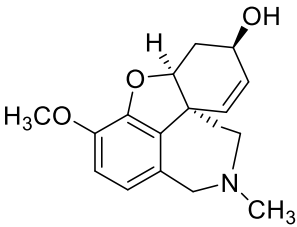
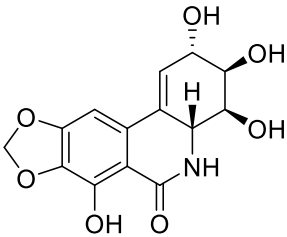
#### **4.3.2.2 Štandardy a chemikálie**

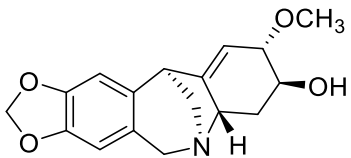
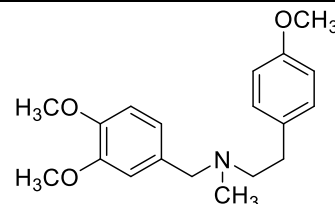
Štandardné reagencie analyzovaných alkaloidov boli izolované na katedre farmaceutickej botaniky, z rastlinných prekurzorov z čeľade Amarylkovité (Amaryllidaceae). Ich čistota (>95%) a štruktúra bola overená pomocou NMR spektroskopie. Chemikálie použité k chromatografickej analýze: metanol (LC-MS čistota), acetonitril (LC-MS čistota), 2-propanol (LC-MS čistota), kyselina mravčia (≥99, pre LC-MS), kyselina trifluóroctová (≥99,9, pre LC-MS), kyselina octová (≥99, pre LC-MS) boli zakúpené z firmy VWR Chemicals (VWR International, Stříbrná Skalice, Česká Republika). Octan amónny (≥99, pre LC-MS) bol zakúpený z firmy Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko). Všetky vodné roztoky mobilnej fázy boli pripravené za použitia 18 MΩ.cm<sup>-1</sup> vody generovanej zo systému Merck Millipore MilliQ, systému reverznej osmózy (Praha, Česká Republika).

### 4.3.3 Vývoj HPLC-MS metódy

Vývoj metódy nadviazal na predchádzajúcu experimentálnu prácu výskumnej skupiny ADINACO, katedry farmaceutickej botaniky. V tejto práci boli optimalizované podmienky analýzy ako rozsah vlnových dĺžok DAD detektora, bola selektovaná vhodná chromatografická kolóna, zloženie mobilnej fázy a boli optimalizované chromatografické parametre, ako prietok a množstvo nastrekovanej vzorky. Boli optimalizované aj parametre hmotnostnej detekcie, ako napätie na kapiláre, teplota sondy, napätie kužľa a rozsah m/z. Táto metóda bola testovaná na vzorkách štandardov a na vzorkách frakcií, z totálneho alkoholového extraktu, z čeľade Amarylkovité (Amaryllidaceae). Tieto látky sú sumarizované v Tabuľke 18. Vzhľadom na veľké množstvo experimentálne skúmaných látok a derivátov, bolo vybraných niekoľko látok na testovanie, pomocou ktorých boli optimalizované podmienky separácie. Tieto látky sú označené červenou farbou.

**Tabuľka 18** Prehľad základných štruktúrnych typov alkaloidov čeľade Amarylkovité a ich základné vlastnosti, vypočítané podľa programu ChemDraw

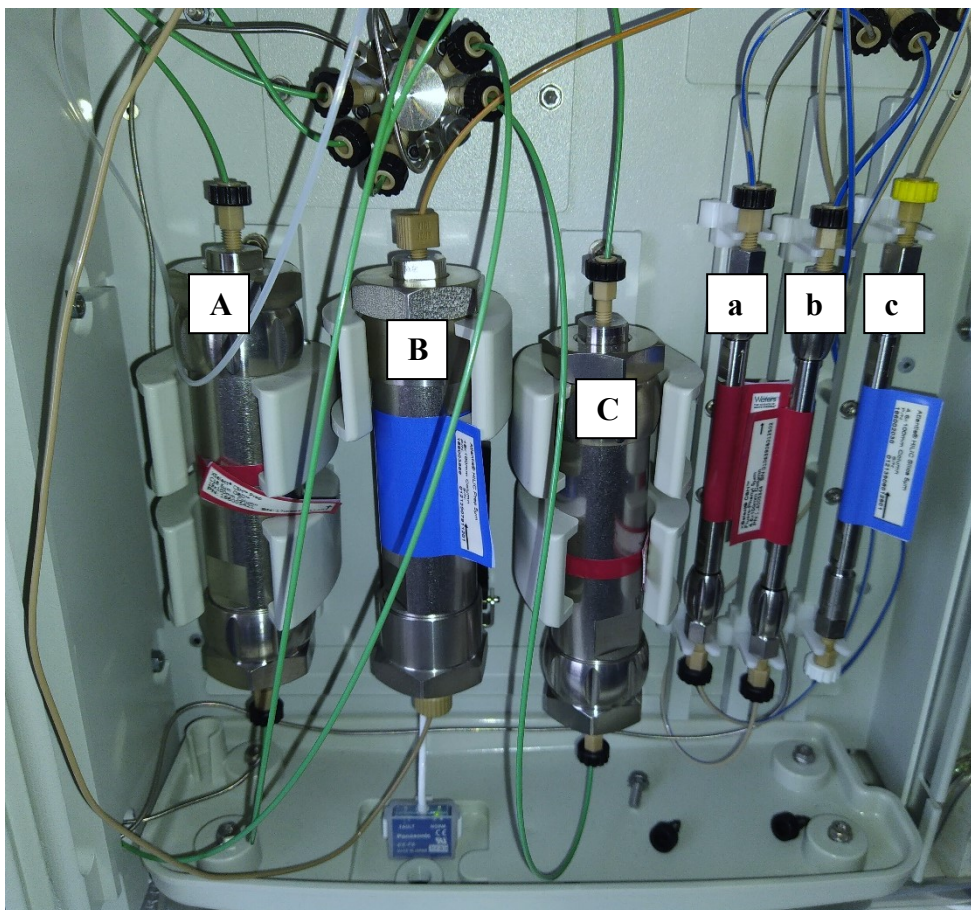
Analyt	štruktúra	logP	M <sub>r</sub>	pK <sub>a</sub>
<b>Lykorín</b>		0,35	287,315	pKa(a) 13,782 pKa(b) 7,362
<b>Homolykorín</b>		1,53	315,369	8,063
<b>Tazettín</b>		1,57	331,368	pKa(a) 12,307 pKa(b) 7,487
<b>Haemantamín</b>		0,98	301,342	pKa(a) 14,087 pKa(b) 7,292
<b>Krinín</b>		1,44	271,316	pKa(a) 14,260 pKa(b) 8,109
<b>Galantamín</b>		1,41	287,359	pKa(a) 14,050 pKa(b) 8,882
Narciklasín		-1,46	307,258	pKa(a) 19,128 pKa(b) 6,705

Analyt	štruktúra	logP	M <sub>r</sub>	pK <sub>a</sub>
Montanín		0,62	301,342	pK <sub>a</sub> (a) 14,139 pK <sub>a</sub> (b) 7,390
Belladín		3,61	315,413	9,352

#### 4.3.3.1 Optimalizácia chromatografických podmienok

Prvým krokom pri vývoji metódy, bol výber vhodných separačných podmienok tak, aby v budúcnosti mohla byť metóda prenesená z analytického módu, do módu preparatívnej chromatografie, a aplikovaná na čo najväčšie množstvo stanovovaných látok na katedre. Z toho dôvodu došlo k obmedzeniu výberu kolón na 3 druhy stacionárnych fáz, ktoré boli dostupné pre obidva režimy.

Jednalo sa o kolóny XSelect® CSH™ C18 (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm a 100 mm x 19 mm i.d., 5 µm), XSelect® CSH™ Fluoro-Phenyl (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm a 100 mm x 19 mm i.d., 5 µm), a Atlantis® HILIC Silica (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm a 100 mm x 19 mm i.d., 5 µm), od firmy Waters (Waters Corporation, Milford, USA). Pri voľbe podmienok bolo postupované tak, aby boli látky v zmesi, pokiaľ je to možné, dostatočne separované a spoľahlivo detegované, v čo najkratšom možnom čase.



**Obrázok 24** Kolóny použité na chromatografickú analýzu

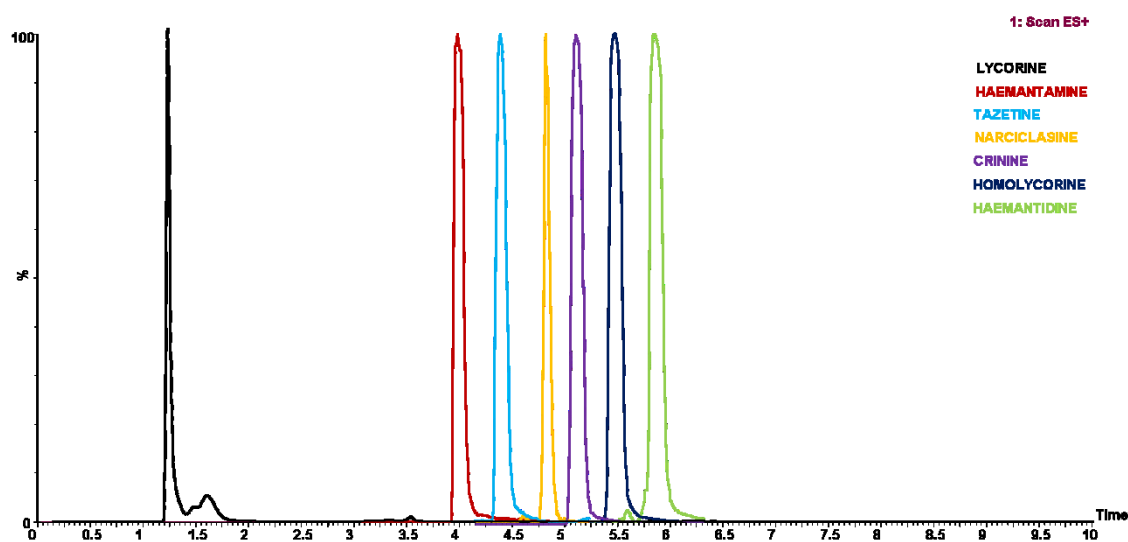
**Preparatívne kolóny (vľavo):** A - XSelect® CSH™ Prep C18 5 $\mu$ m OBD™ kolóna (19 $\times$ 100 mm), B - Atlantis® HILIC Prep 5 $\mu$ m kolóna (19 $\times$ 100 mm), C - XSelect® CSH™ Prep Fluoro-Phenyl 5 $\mu$ m OBD™ kolóna (19 $\times$ 100 mm); **Analytické kolóny (vpravo):** a - XSelect® CSH™ C18 5 $\mu$ m kolóna (4,6 $\times$ 100 mm), b - XSelect® CSH™ Fluoro-Phenyl 5 $\mu$ m kolóna (4,6 $\times$ 100 mm), c - Atlantis® HILIC Silica 5 $\mu$ m kolóna (4,6 $\times$ 100 mm)

Okrem reverznej fázy bola testovaná aj separácia v HILIC usporiadaní. Vzhľadom na širokú škálu analyzovaných látok, ich rozdielne fyzikálno-chemické vlastnosti, relatívne rozdielne hodnoty polarít týchto analytov a problémy s narušením separačného prostredia počas separácie, nízkej opakovateľnosti, kvôli prekročeniu deliacej kapacity kolóny a vysokým koncentráciám látok v extraktoch, sme sa rozhodli upustiť od využitia HILIC kolón.

V súvislosti s limitmi prístrojového vybavenia a stacionárnej fázy a prípadnej budúcej ekonomickej náročnosti pri preparatívnej separácii, boli volené podmienky tak, aby došlo k čo možno najväčšiemu využitiu vodnej zložky v mobilnej fáze. Na základe dostupných literárnych zdrojov [153] boli zvolené testovacie podmienky zloženia pre mobilnú fázu.



Na základe predchádzajúcej literárnej rešerše bola testovaná veľká časť navrhovaných separačných postupov. Testovalo sa niekoľko druhov modifikátorov mobilnej fázy, v kombinácii s 2-propanolom, acetonitrilom a metanolom, v rôznych percentuálnych pomeroch. Najvhodnejšou kombináciou mobilnej fázy k daným alkaloidom sa javila kombinácia 0,1% kyseliny mravčej spolu s metanolom. Z dosiahnutých výsledkov však bolo zrejmé, že rozlíšenie na Fluoro-fenylovej kolóne nie je dostatočné na úspešnú identifikáciu a preparatívne účely v prípade interferujúcich látok prítomných v rastlinnom extrakte. Z toho dôvodu bola zvolená kolóna s reverznou fázou XSelect C18. V izokratickom móde pri dávkovaní 15% metanolu bol celkový čas analýzy 38 minút. Preto bol zvolený gradientový prístup k separácii. Tým došlo k zlepšeniu tvaru



Obrázok 25 Chromatogram delenia štandardných látok alkaloidov

#### 4.3.3.2 Optimalizácia podmienok hmotnostnej detekcie

Pri optimalizácii podmienok hmotnostnej detekcie sme postupovali tak, aby sme získali čo možno najväčšiu odozvu signálu pre všetky sledované analyty. Preto boli optimalizované parametre merané tak, aby bolo dosiahnuté vždy jedno meranie, s každou zmenou podmienok.

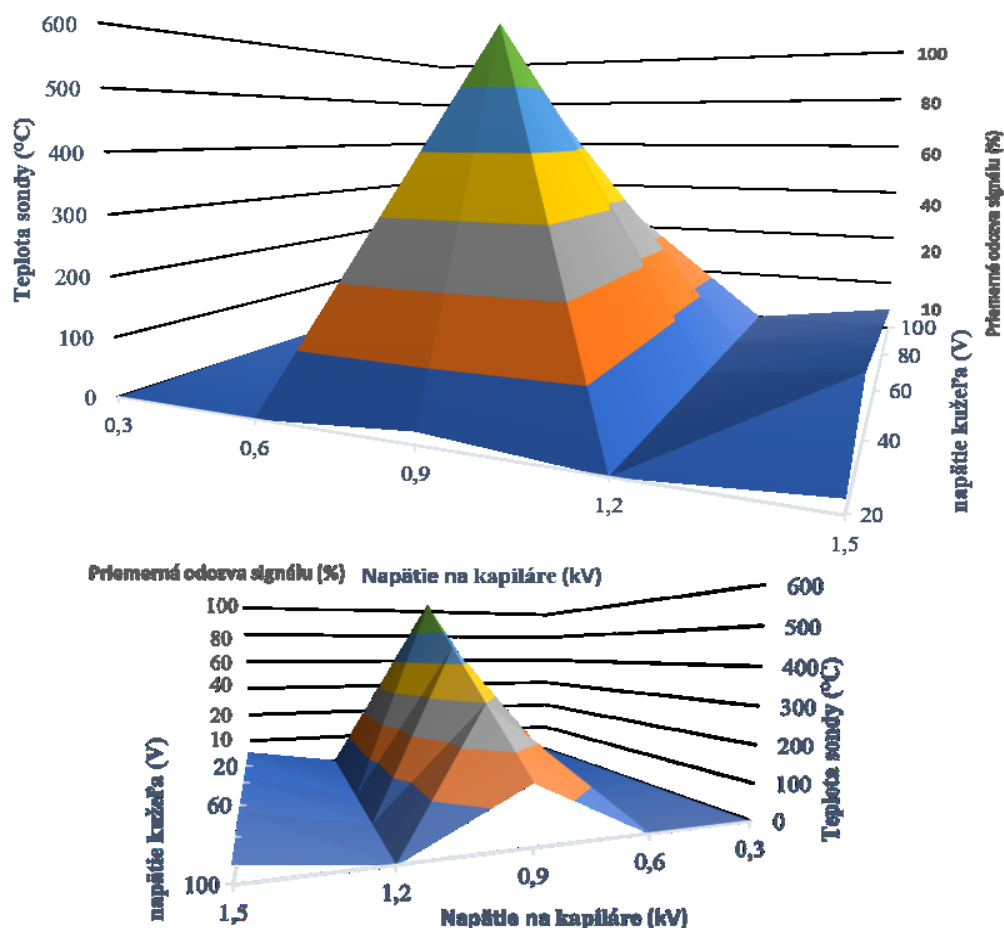
Citlivosť detektora bola ponechaná na hodnote 1. Detektor pracoval v pozitívnom móde elektro-sprejovej ionizácie v kontinuálnom režime. Nastavenie sledovania celkového počtu iónov (TIC), s ohľadom na molekulové hmoty analytov, bolo zvolené v rozmedzí 200 – 800 m/z. Rýchlosť zberu dát bola 20 Hz. Ostatné parametre ako napätie

na kapiláre, teplota sondy a napätie na kuželi boli optimalizované v celom ich rozsahu. Hodnoty sú sumarizované v Tabuľke 20.

**Tabuľka 20** Prehľad optimalizovaných parametrov hmotnostnej detekcie a ich hodnôt

Napätie na kapiláre (kV)	Teplota sondy (°C)	Napätie kužela (V)
0,3	20	20
0,6	150	40
0,9	300	60
1,2	450	80
1,5	600	100

Keďže cieľom bolo nájsť také podmienky, ktoré by boli vyhovujúce pre všetky sledované analyty a do budúcnosti i analyty neznáme, ich intenzity a plochy boli spriemerované a porovnané navzájom.



**Obrázok 26** Porovnanie zmeny parametrov hmotnostnej detekcie, na priemernú intenzitu signálov

3D graf zobrazuje závislosť sledovaných parametrov, ako teplota (°C), napätie na kapiláre (kV), napätie na kuželi (V) na priemernej odozve signálu (%) pri MS detekcii v ESI+ móde. Pre lepšiu prehľadnosť sú farebne vyznačené jednotlivé hodnoty teploty sondy.

#### 4.3.3.3 Úprava vzorky pred analýzou

Vzorky použité na analýzu boli získavané zo sumárnych etanolových extraktov rastlín obsahujúcich alkaloidy. Tie boli prečistené pomocou LLE, preparatívnej TLC, stĺpcovej chromatografie, alebo Flash chromatografie a rozdelené do frakcií, na základe chromatografie na tenkej vrstve. Následne bolo z amfotérnej vzorky odobrané množstvo cca. 0,2 – 0,6 mg a rozpustené v 1 - 1,5 ml metanolu, LC-MS kvality. Tieto frakcie podstúpili HPLC-MS a GC-MS analýzu. Perspektívne pod-frakcie následne prešli ďalším delením, pomocou preparatívnej chromatografie s rovnakými základnými podmienkami tak, aby ich čistota bola minimálne 90%.

#### 4.3.4 Finálne podmienky analýzy

##### Chromatografické podmienky

LC systém: Waters Autopurification HPLC/MS/PDA system

Kolóna: XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Waters Corporation, Milford, USA). Pri laboratórnej teplote.

Mobilná fáza:

Zložka A: 95% - 0,1% kyselina mravčia vo vode, 5% metanol

Zložka B: metanol s 0,1% kyselinou mravčou

Gradientová elúcia, 1 ml/min:

Elučný program s gradientom bol naprogramovaný nasledovne (v / v):  
0 min = 5% B, 5 min = 100% B (konkávny typ gradientu č. 7), 8,5 min = 5% B (lineárny typ gradientu č. 6), nasledovaný 1,5 minútou, k návratu na počiatočné podmienky pre ekvilibračiu.

Objem nástreku: 5 µl

PDA Detektor:

Rozsah detektora: 200 do 420 nm

Frekvencia zberu dátových bodov: 20 Hz

Citlivosť: Normálna

Zosilnenie: 1×

#### qDa Detektor:

ESI pozitívny mód

Kapilárne napätie: 0,8 kV

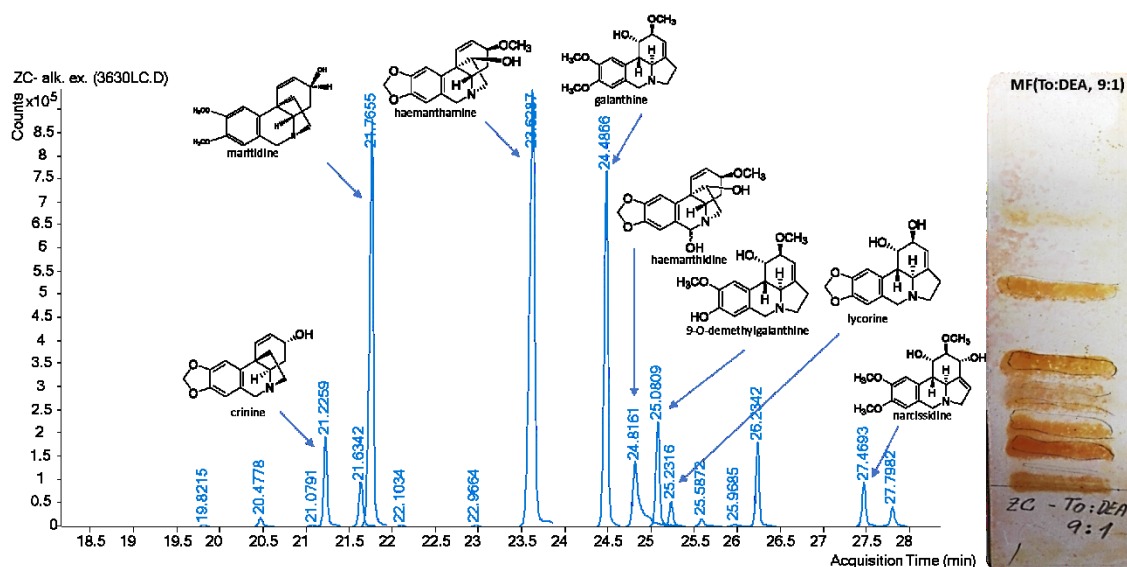
Teplota sondy: 600 °C

Napätie kužela: 20V

Rozsah sledovania : 200 - 800 m/z

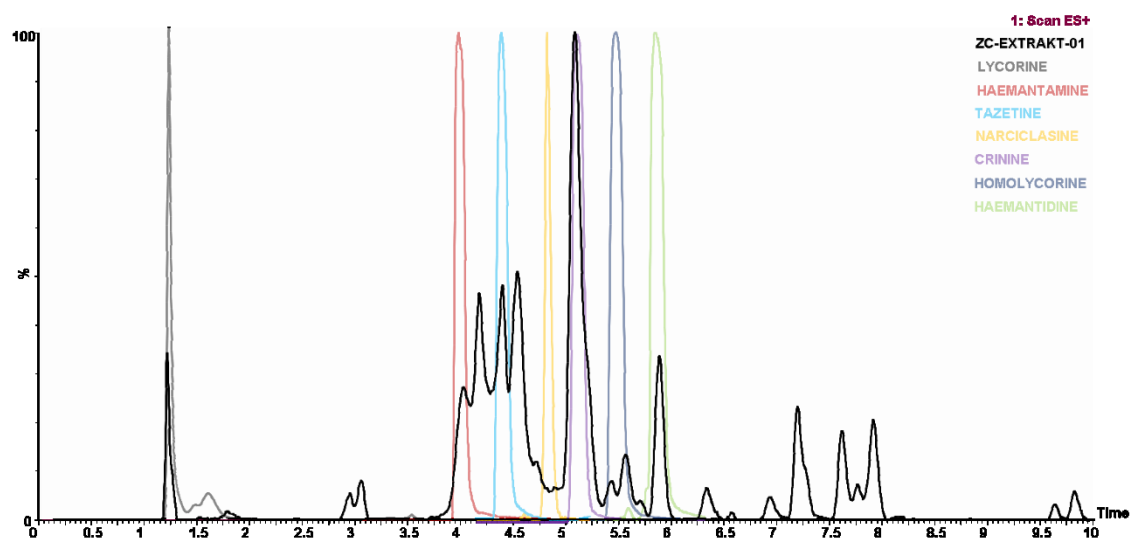
### 4.3.5 Aplikácia metódy na reálne vzorky

Metóda bola aplikovaná na katedre farmaceutickej botaniky, na posudzovanie kompozície alkaloidných extraktov nielen čeľade Amarylkovitých, ale i čeľadí, ako Papaveraceae, či Nitrariaceae a mnohých ďalších. Jej pomocou je možné hodnotiť čistotu extrahovaných látok a zistiť ich molekulovú hmotnosť. Tieto experimenty odhalili, že bolo možné pozorovať a monitorovať rozdiely v pomerovom zastúpení jednotlivých alkaloidov. Vďaka hmotnostnej detekcii, ktorá je v podstate ďalšou separačnou technikou, je možné odhaliť aj interferencie, ktoré by mali rovnaké retenčné charakteristiky, ako cieľové analyty.

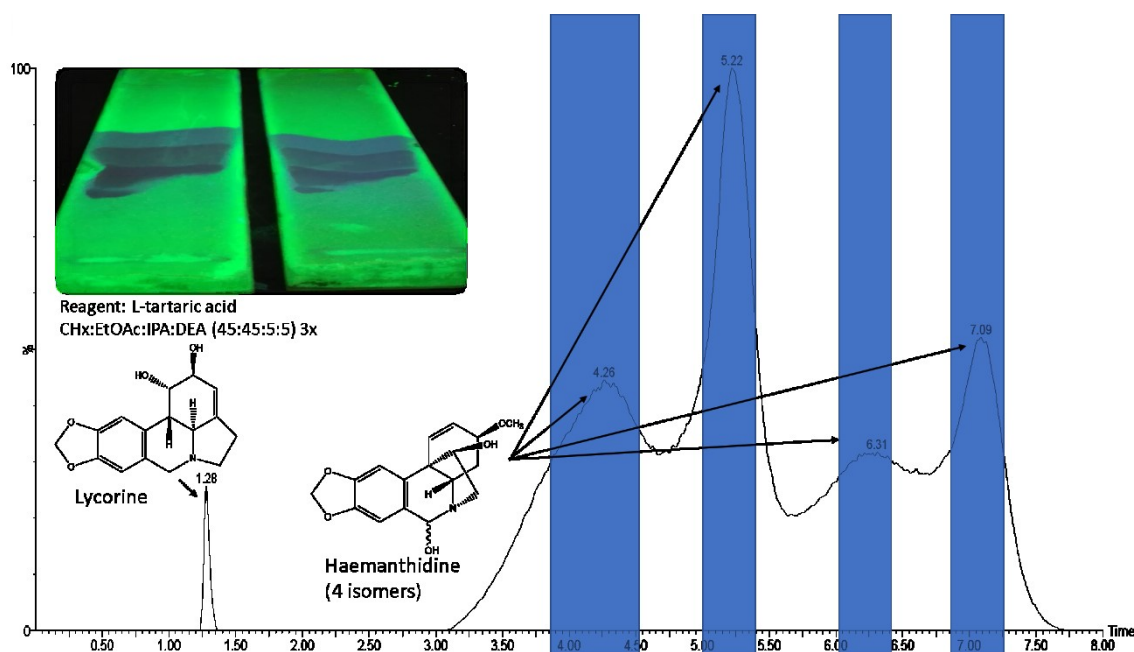


**Obrázok 27** GC-MS chromatogram alkaloidného extraktu z rastliny *Zephyranthes Citrina* v porovnaní s TLC

GC-EI-MS záznam (70 eV), kolóna HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Teplotný gradient: 100 - 180 °C (15 °C/min), 1 min. - 180 °C, 180 - 300 °C (5 °C/min), 5 min. - 300 °C. Detekčný rozsah - 40 – 600 m/z. Teplota injektora - 280 °C. Prietok hélia - 0,8 ml/min. Nástrek 1 μl, split 1:15. Jednotlivé látky sú identifikované porovnaním s knižnicou NIST 2011, a knižnicou alkaloidov, ktorá na katedre vznikla.



**Obrázok 28** LC-MS Chromatogram alkaloidného extraktu z rastliny *Zephyranthes Citrina*



**Obrázok 29** Chromatogram frakcionácie purifikovaného haemanthidínu z extraktu rastliny *Zephyranthes Citrina* na získanie čistých frakcií jeho izomérov v porovnaní s chirálnou TLC.

Preparatívny LC-ESI+ záznam (TIC), kolóna XSelect® CSH™ Prep C18 5µm OBD™ (19×100 mm, Waters Corporation, Milford, USA). Prietok – 17,06 ml/min, nástrek 1000 µl.

Prietokový gradient: 0 min: 100% A : 0% B, 1 – 8 min. = 100% A – 0% A – gradient č. 8, 8 - 10 min. – 0% A – 100% A – gradient č. 11. Detekčný rozsah - 200 – 400 m/z, split do MS detektora 1000:1. Modrou farbou sú vyznačené časy zberu frakcií.

#### 4.3.6 Záver

V tejto práci bola vyvinutá a optimalizovaná nová, jednoduchá chromatografická metóda na monitorovanie zloženia alkaloidných extraktov. Separácia látok, vďaka použitiu relatívne bežnej kolóny s reverznou fázou, je ľahko škálovateľná a vhodná ako „scouting“ metóda, pred prípadnou preparatívnou chromatografiou. Vzhľadom na veľký rozsah monitorovaných látok, rozdielnu kompozíciu, zastúpenie analytov v jednotlivých extraktoch a limitácie prístroja, nie je táto metóda vhodná na kvantitatívne hodnotenie množstva a druhu daných analytov. Poskytuje však ucelený obraz o prítomných látkach, a je vhodná ako dopĺňajúca metodika v kombinácii s ďalšími analytickými metódami. Výhodou tohto prístupu je však možnosť sledovania biologicky aktívnych frakcií po predchádzajúcej preparatívnej separácii daných extraktov, v spojení s testovaním biologickej aktivity – tzv. „bioguided assay“. Pomocou tohoto prístupu je možné značne skrátiť hľadanie potenciálnych látok s cieľným biologickým účinkom.

Táto metóda sa v súčasnosti používa k exploratívnej analýze vzoriek, orientačnému sledovaniu zloženia extraktov, zistenie čistoty vzoriek po ich úprave, alebo k charakterizácii látok po syntéze nových derivátov na Katedre farmaceutickej botaniky, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. Od vývoja metódy bolo na katedre analyzovaných viac ako tisíc štyristo vzoriek a preparatívne spracovaných viac ako 10 gramov extraktov rastlinného pôvodu.

## 5. Záver

Predložená dizertačná práca sa zaoberá vývojom, optimalizáciou, validáciou a využitím separačných metód vhodných na bioanalytické štúdie. V experimentálnej časti práce sú prezentované tri chromatografické metódy spolu s optimalizáciou extrakčného postupu, alebo podmienok separácie.

Prvá prezentovaná metóda sa zaoberá stanovením vitamínu B1 thiamínu a jeho fosforylovaných foriem spolu s biologicky aktívnou formou vitamínu B6, pyridoxal-5fosfátu vo vzorkách plnej krvi. Spoločným cieľom pre metódy používané v klinickom výskume je vyvíjať rýchle a spoľahlivé metodiky s jednoduchou a časovo nenáročnou prípravou vzorky. Z toho dôvodu bol zvolený krok precipitácie proteínov na ich úpravu. Ďalším predpokladom, ktorý bolo nutné brať do úvahy pri vývoji, bolo meranie veľkých sérií vzoriek. Vzorky boli získané od dobrovoľných darcov z III. Internej gerontometabolickej kliniky, Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Postup odberu bol predtým schválený Etickou komisiou Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Separácia látok bola dosiahnutá s využitím kolóny, s povrchovo poréznymi časticami Meteoric Core C18 (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Nemecko). Metóda bola validovaná a testovaná na reálnych vzorkách. Okrem publikácie metódy v časopise s IF, bol publikovaný aj prehľadový článok, zaoberajúci sa problematikou analýzy vitamínu B1. V súčasnosti je metóda zavedená do spektra vyšetrení vo výskumnom laboratóriu Úseku výskumu a výuky Fakultnej nemocnice v Hradci Králové.

Druhá metóda pojednáva o optimalizácii procesu extrakcie z kvapaliny do kvapaliny a predikcii distribúcie aj u vzoriek s neznámym zložením. Výsledkom je prediktívny algoritmus, schopný na základe len niekoľkých experimentálnych pokusov, navrhnúť extrakčné podmienky pri LLE, odporučiť najvhodnejšie rozpúšťadlo na separáciu balastných látok, alebo cieľového analytu, zo zmesi rôzneho zloženia. Algoritmus, rovnako ako aj metódy použité na ich analýzu prešli komplexným testovaním a štatistickou validáciou. Vytvorený algoritmus, spolu s experimentálnou metodológiou, bol publikovaný v časopise vydávanom Americkou Chemickou spoločnosťou (ACS - American Chemical Society).

Posledná časť experimentálnej práce sa zaoberá vývojom a optimalizáciou podmienok detekcie alkaloidov v rastlinných extraktoch. Jedná sa o skriningovú metódu, ktorej podmienky boli publikované v dvoch spoluautorských publikáciách z Katedry farmaceutickej botaniky. Okrem iného metóda slúži pri hľadaní vhodných podmienok na

preparatívnu separáciu a optimalizáciu preparatívneho delenia, do hmotnosti extraktu na jednu analýzu až 100 mg.



## 6. PREHĽAD PUBLIKOVANÝCH PRÁC A PRÍSPEVKOV

### 6.1 PUBLIKÁCIE

1. **Jenčo J.**, Krčmová Kujovská L., Solichová D., Solich P., Recent trends in determination of thiamine and its derivatives in clinical practice, Journal of Chromatography A, 1510 (2017), 1-12, Q1, IF<sub>2019</sub> = 4,049

Prínos doktoranda: literárna rešerš, spísanie publikácie

2. Tshepelevitsh S., Hernits K., **Jenčo J.**, Hawkins J.M., Muteki K., Solich P., Leito I., Systematic Optimization of Liquid-Liquid Extraction for Isolation of Unidentified Components, ACS Omega, 2 (2017), 7772-7776, Q2, IF<sub>2019</sub> = 2,870

Prínos doktoranda: meranie pomocou kvapalinovej chromatografie, spracovanie analytických výsledkov, podiel na vývoji algoritmu a programu

3. **Jenčo J.**, Krčmová Kujovská L., Sobotka L., Bláha V., Solich P., The development of the liquid chromatography method for the clinical monitoring of vitamin B1 metabolites and B6 status in whole blood, Talanta, 211 (2020), 120702, Q1, IF<sub>2019</sub> = 5,339

Prínos doktoranda: príprava experimentov, vývoj, optimalizácia a validácia metódy, spísanie publikácie

4. Breiterová K., Koutová D., Maříková J., Havelek R., Kuneš J., Majorošová M., Opletal L., Hošťálková A., **Jenčo J.**, Řezáčová M., Cahlíková L., Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from Narcissus L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity, Plants, 9 (2020), 137, Q1, IF<sub>2019</sub> = 2,632

Prínos doktoranda: analytické merania vybraných frakcií a látok pomocou HPLC-MS a GC-MS

5. Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Kohelová E., De Simone A., Al Mamun A., Hulcová D., Marková J., Kučera T., Jun D., Šafratová M., Maříková J., Andrisano V., **Jenčo J.**, Kuneš J., Martinez A., Nováková L., Cahlíková L., Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimers disease, Bioorganic chemistry, 100 (2020), 103928, Q1, IF<sub>2019</sub> = 4,831

Prínos doktoranda: analytické merania vybraných frakcií a látok pomocou HPLC-MS a GC-MS

6. Kohelová E., Maříková J., Korábečný J., Hulcová D., Kučera T., Jun D., Chlebek J., **Jenčo J.**, Šafratová M., Hrabínová M., Ritomská A., Malaník M., Peřinová R., Breiterová K., Kuneš J., Nováková L., Opletal L., Cahlíková L., Alkaloids of Zephyranthes citrina (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity, Bioorganic chemistry, 107 (2021), 104567, Q1, IF<sub>2019</sub> = 4,831

Prínos doktoranda: analytické merania vybraných frakcií a látok pomocou HPLC-MS a GC-MS

## 6.2 PREDNÁŠKY

1. **Jenčo J.,** Kujovská Krčmová L., Netriová J., Solich P., Monitoring of septic conditions by biological markers  
5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, Česká Republika, 3. - 4.2.2015
2. **Jenčo J.,** Netriová J., Stanovenie vybraných biochemických parametrov a ich diagnostické a prognostické hodnoty useptických ochorení  
ZDRAVLAB-15 II. Vedecká a odborná konferencia pracovníkov laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve, Trenčianske Teplice, Slovensko, 11. – 12.2.2015
3. **Jenčo J.,** Kujovská Krčmová L., Solichová D., Solich P., Development of extraction procedure for the determination of thiamine and its derivatives in biological fluids  
6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, Česká Republika, 9. - 10.2.2016
4. **Jenčo J.,** Kujovská Krčmová L., Solichová D., Solich P., Testing of several stationary phases in the Analysis of B vitamins  
7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, Česká Republika, 7. - 8.2.2017
5. **Jenčo J.,** Kujovská Krčmová L., Sobotka L., Solich P., Stanovenie metabolitov vitamínu B1 pomocou kvapalinovej chromatografie vhodné pre klinické aplikácie  
ZDRAVLAB-17 IV. Vedecká a odborná konferencia pracovníkov laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve, Trenčín, Slovensko, 09. – 10.2.2017
6. **Jenčo J.,** Kujovská Krčmová L., Solichová D., Solich P., Chromatographic method for the assessment of vitamin B1 and B6 derivatives in whole blood  
8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, Česká Republika, 24. – 25.1.2018

7. **Jenčo J.**, Kujovská Krčmová L., Sobotka L., Solich P., Chromatographic analysis of vitamin B1 and B6 derivatives in whole blood  
Merck XVIII. Interdisciplinary Meeting of young life scientists, Milovy, Česká Republika, 14. - 17.5.2018
8. **Jenčo J.**, Kohelová E., Peřinová R., Cahlíková L., The use of preparative HPLC-MS for the isolation of minor alkaloids from *Zephyranthes citrina* – in search for new drugs for anticancer therapy  
7. ročník konferencie Česká chromatografická škola – HPLC 2019, Zaječí, Česká Republika, 12. – 15.5.2019

### 6.3 PLAGÁTOVÉ PREZENTÁCIE

#### Prezentujúci autor:

1. **Jenčo J.**, Kujovská Krčmová L., Chadtová A., Solichová D., Solich P.,  
Determination of thiamine and its phosphorylated forms in routine diagnostics  
42<sup>nd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase  
Separations and Related Techniques (HPLC), Ženeva, Švajčiarsko, 21.-  
25.6.2015
2. **Jenčo J.**, Kujovská Krčmová L., Javorská L., Čentíková K., Solichová D., Solich P., Chromatographic analysis of thiamine and its derivatives for routine diagnostics in whole blood  
45<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase  
Separations and Related Techniques (HPLC), Praha, Česká Republika,  
18.-22.6.2017  
**Springer Best poster award**
3. **Jenčo J.**, Kujovská Krčmová L., Sobotka L., Solich P.; Chromatographic method for the assessment of vitamin B1 and B6 derivatives in whole blood  
Analítica 2018 – 9th Meeting of Division of Analytical Chemistry, Porto, Portugal, 26. – 27.3.2018

## **7. ÚČASŤ NA PROJEKTOCH A STÁŽACH**

### **7.1 GRANTOVÉ PROJEKTY**

2019 – 2020 AZV MZ ČR 18-03-00130 – Studium specifických faktorů ovlivňujících toxicitu hypertermické intraperitoneální chemoterapie – člen řešitelského týmu

### **7.2 ABSOLVOVANÉ STÁŽE**

2015 Zahraničná stáž na University of Tartu, Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Tartu, Estónsko  
(6 mesiacov – Program Erasmus +)

## 8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Generovaná programom EndNote X9 (štýl Analytica Chimica Acta)

- [1] F. Batifoulier, M.A. Verny, C. Besson, C. Demigne, C. Remesy, Determination of thiamine and its phosphate esters in rat tissues analyzed as thiochromes on a RP-amide C16 column, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 816 (2005) 67-72.
- [2] W.O. Song, G.R. Beecher, R.R. Eitenmiller, *Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins*, Wiley2000.
- [3] R. Losa, M.I. Sierra, A. Fernandez, D. Blanco, J.M. Buesa, Determination of thiamine and its phosphorylated forms in human plasma, erythrocytes and urine by HPLC and fluorescence detection: a preliminary study on cancer patients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (2005) 1025-1029.
- [4] X.L. Pan, S.M. Sang, G.Q. Fei, L.R. Jin, H.M. Liu, Z.L. Wang, H. Wang, C.J. Zhong, Enhanced Activities of Blood Thiamine Diphosphatase and Monophosphatase in Alzheimer's Disease, *Plos One*, 12 (2017) 13.
- [5] J. Lu, E.L. Frank, Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood, *Clinical Chemistry*, 54 (2008) 901-906.
- [6] R. Mancinelli, M. Ceccanti, M.S. Guiducci, G.F. Sasso, G. Sebastiani, M.L. Attilia, J.P. Allen, Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 789 (2003) 355-363.
- [7] P.L.M. Lynch, I.S. Young, Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 881 (2000) 267-284.
- [8] V.R. Preedy, B. Adamolekun, C. Royal Society of, B. Do, *B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Royal Society of Chemistry2012.
- [9] L. Tretter, V. Adam-Vizi, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 2335-2345.
- [10] M. Ahmed, P. Azizi-Namini, A.T. Yan, M. Keith, Thiamin deficiency and heart failure: the current knowledge and gaps in literature, *Heart Failure Reviews*, 20 (2015) 1-11.

- [11] E. Abdou, A.S. Hazell, Thiamine Deficiency: An Update of Pathophysiologic Mechanisms and Future Therapeutic Considerations, *Neurochemical Research*, 40 (2015) 353-361.
- [12] M.G. Allison, M.T. McCurdy, Alcoholic Metabolic Emergencies, *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32 (2014) 293-+.
- [13] P. Waheed, A.K. Naveed, T. Ahmed, Thiamine deficiency and its correlation with dyslipidaemia in diabetics with microalbuminuria, *Journal of the Pakistan Medical Association*, 63 (2013) 340-345.
- [14] B.J. McCabe, Prevention of food-drug interactions with special emphasis on older adults, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7 (2004) 21-26.
- [15] J.C. Kerns, C. Arundel, L.S. Chawla, Thiamin Deficiency in People with Obesity, *Advances in Nutrition*, 6 (2015) 147-153.
- [16] A.D. Raval, D. Thakker, A.N. Rangoonwala, D. Gor, R. Walia, Vitamin B and its derivatives for diabetic kidney disease, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2015) 63.
- [17] M. Halma, B. Doumeche, L. Hecquet, V. Prevot, C. Mousty, F. Charmantray, Thiamine biosensor based on oxidative trapping of enzyme-substrate intermediate, *Biosensors & Bioelectronics*, 87 (2017) 850-857.
- [18] J. Puts, M. de Groot, M. Haex, B. Jakobs, Simultaneous Determination of Underivatized Vitamin B1 and B6 in Whole Blood by Reversed Phase Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Plos One*, 10 (2015) 15.
- [19] N. Endo, K. Nishiyama, A. Otsuka, H. Kanouchi, M. Taga, T. Oka, Antioxidant activity of vitamin B-6 delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats, *British Journal of Nutrition*, 95 (2006) 1088-1093.
- [20] H. Tsuge, N. Hotta, T. Hayakawa, Effects of vitamin B-6 on (n-3) polyunsaturated fatty acid metabolism, *Journal of Nutrition*, 130 (2000) 333S-334S.
- [21] S.L. Dawson, S.J. Bowe, T.C. Crowe, A combination of omega-3 fatty acids, folic acid and B-group vitamins is superior at lowering homocysteine than omega-3 alone: A meta-analysis, *Nutrition Research*, 36 (2016) 499-508.
- [22] S.P. Coburn, A. Slominski, J.D. Mahuren, J. Wortsman, L. Hessle, J.L. Millan, Cutaneous metabolism of vitamin B-6, *Journal of Investigative Dermatology*, 120 (2003) 292-300.

- [23] M. Parra, S. Stahl, H. Hellmann, Vitamin B-6 and Its Role in Cell Metabolism and Physiology, *Cells*, 7 (2018) 28.
- [24] K.E. Hoad, L.A. Johnson, G.A. Woollard, T.A. Walmsley, S. Briscoe, L.M. Jolly, J.P. Gill, R.F. Greaves, Vitamin B1 and B6 method harmonization: Comparison of performance between laboratories enrolled in the RCPA Quality Assurance Program, *Clinical Biochemistry*, 46 (2013) 772-776.
- [25] R. Roelofsen-de Beer, B.D. van Zelst, S. Kos, R. Maatman, R. de Jonge, Y.B. de Rijke, A multicenter effort to improve comparability of vitamin B6 assays in whole blood, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 56 (2018) E23-E26.
- [26] C.K. Markopoulou, K.A. Kagkadis, J.E. Koundourellis, An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B-1, B-6, B-12, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30 (2002) 1403-1410.
- [27] J. Jenco, L.K. Krcmova, D. Solichova, P. Solich, Recent trends in determination of thiamine and its derivatives in clinical practice, *Journal of Chromatography A*, 1510 (2017) 1-12.
- [28] K.A. Edwards, N. Tu-Maung, K. Cheng, B.B. Wang, A.J. Baeumner, C.E. Kraft, Thiamine Assays-Advances, Challenges, and Caveats, *Chemistryopen*, 6 (2017) 178-191.
- [29] R. Roelofsen-de Beer, B.D. van Zelst, R. Wardle, P.G. Kooij, Y.B. de Rijke, Simultaneous measurement of whole blood vitamin B1 and vitamin B6 using LC-ESI-MS/MS, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1063 (2017) 67-73.
- [30] W. Stuetz, V.I. Carrara, R. McGready, S.J. Lee, H.K. Biesalski, F.H. Nosten, Thiamine Diphosphate in Whole Blood, Thiamine and Thiamine Monophosphate in Breast-Milk in a Refugee Population, *Plos One*, 7 (2012) 6.
- [31] D. Talwar, H. Davidson, J. Cooney, D.S.J. O'Reilly, Vitamin B-I status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: Comparison with erythrocyte transketolase activation assay, *Clinical Chemistry*, 46 (2000) 704-710.
- [32] L.Q. Chen, Z.Y. Liu, X.J. Kang, X.L. Zhou, S.L. Zheng, Z.Z. Gu, Determination of Fat-soluble Vitamins in Food and Pharmaceutical Supplements Using Packed-fiber Solid Phase Extraction (PFSPE) for Sample Preconcentration/Clean-up, 2011



- International Conference on Environment Science and Biotechnology (Icesb 2011), 8 (2011) 588-595.
- [33] B. Hucker, L. Wakeling, F. Vriesekoop, The Quantitative Analysis of Thiamin and Riboflavin and Their Respective Vitamers in Fermented Alcoholic Beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 12278-12285.
- [34] J. Jenco, L.K. Krcmova, L. Sobotka, V. Blaha, P. Solich, F. Svec, Development of novel liquid chromatography method for clinical monitoring of vitamin B-1 metabolites and B-6 status in the whole blood, *Talanta*, 211 (2020) 9.
- [35] X.P. Xue, J.M. You, P.L. He, Simultaneous determination of five fat-soluble vitamins in feed by high-performance liquid chromatography following solid-phase extraction, *Journal of Chromatographic Science*, 46 (2008) 345-350.
- [36] S. Chan, Q. Jiang, R. Reitz, Mass spectrometry method for measuring thiamine in body fluid, Google Patents, 2009.
- [37] S. Shankar, S.A. John, Sensitive and highly selective determination of vitamin B1 in the presence of other vitamin B complexes using functionalized gold nanoparticles as fluorophore, *Rsc Advances*, 5 (2015) 49920-49925.
- [38] X.Y. Wei, L. Qi, J.A. Qiao, C.H. Yao, F.Y. Wang, Y. Chen, Assay of vitamin B in urine by capillary electrochromatography with methacrylate-based monolithic column, *Electrophoresis*, 31 (2010) 3227-3232.
- [39] R.W. Korner, A. Vierzig, B. Roth, C. Muller, Determination of thiamin diphosphate in whole blood samples by high-performance liquid chromatography-A method suitable for pediatric diagnostics, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877 (2009) 1882-1886.
- [40] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 880 (2000) 35-62.
- [41] L. Jia, Y.L. Liu, Y.Y. Du, D. Xing, Pressurized capillary electrochromatographic analysis of water-soluble vitamins by combining with on-line concentration technique, *Journal of Chromatography A*, 1154 (2007) 416-422.
- [42] C.N. Yin, Y.H. Cao, S.D. Ding, Y. Wang, Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 172-177.
- [43] D.C. da Silva, J.V. Visentainer, N.E. de Souza, C.C. Oliveira, Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of the Ten Water-Soluble Vitamins in Food Supplements, *Food Analytical Methods*, 6 (2013) 1592-1606.

- [44] E. Serni, V. Audino, S. Del Carlo, C. Manera, G. Saccomanni, M. Macchia, Determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary supplements and in artichokes by micellar electrokinetic chromatography, *Natural Product Research*, 27 (2013) 2212-2215.
- [45] I. Oledzka, P. Kowalski, T. Baczek, B. Muszynska-Furas, J. Paradziej-Lukowicz, M. Taciak, B. Pastuszewska, Determination of water soluble vitamins in laboratory animal feeds by micellar electrokinetic chromatography, *Analytical Letters*, 45 (2012) 689-701.
- [46] D. Bohrer, P.C. do Nascimento, A.G. Ramirez, J.K.A. Mendonca, L.M. de Carvalho, S.C.G. Pomblum, Determination of thiamine in blood serum and urine by high-performance liquid chromatography with direct injection and post-column derivatization, *Microchemical Journal*, 78 (2004) 71-76.
- [47] O.S. Al-Attas, N.M. Al-Daghri, A.A. Alfadda, S.H. Abd-Alrahman, S. Sabico, Blood thiamine and its phosphate esters as measured by high-performance liquid chromatography: Levels and associations in diabetes mellitus patients with varying degrees of microalbuminuria, *Journal of Endocrinological Investigation*, 35 (2012) 951-956.
- [48] Kromasil, Vitamins - Separation of water soluble vitamins in HILIC mode pp. application g1024.
- [49] S. Technologies, HILIC Separation of Vitamins Group B, 2018.
- [50] Phenomenex, Water-soluble vitamins on Kinetex 2.6um HILIC 150 x 4.6mm, Application Detail (App ID: 18842).
- [51] Y.S. Technology, HILIC Separation of Water-soluble vitamins.
- [52] I. Anne Mack - Agilent Technologies, Analysis of Water-Soluble Vitamins on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 Column, 2017.
- [53] S.-A.C. LLC, HILIC Analysis of Polar Vitamins on Ascentis® Express OH5, 2018.
- [54] S. Baurer, W.K. Guo, S. Polnick, M. Lammerhofer, Simultaneous Separation of Water and Fat Soluble Vitamins by Selective Comprehensive HILIC x RPLC (High Resolution Sampling) and Active Solvent Modulation (vol 82, pg 167, 2019), *Chromatographia*, 83 (2020) 1159-1159.
- [55] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, Study of the Behavior of Water-Soluble Vitamins in HILIC on a Diol Column, *Chromatographia*, 71 (2010) 751-759.

- [56] P. Vinas, C. Lopez-Erroz, N. Balsalobre, M. Hernandez-Cordoba, Comparison of ion-pair and amide-based column reversed-phase liquid chromatography for the separation of thiamine-related compounds, *Journal of Chromatography B*, 757 (2001) 301-308.
- [57] S.U. Bajad, W.Y. Lu, E.H. Kimball, J. Yuan, C. Peterson, J.D. Rabinowitz, Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1125 (2006) 76-88.
- [58] J.B. Matthias Güntert, R. Emberger, R. Hopp, M. Köpsel, H. Surburg, and P. Werkhoff, Thermally Degraded Thiamin A Potent Source of Interesting Flavor Compounds, *Flavor Precursors*, ACS Symposium, 1992, pp. 140-163.
- [59] Ihara H, Reference values for whole blood thiamine and thiamine phosphate esters in Japanese adults., in: Hirano A (Ed.), *J Anal Bio-Sci*, 2005, pp. 241–246
- [60] V.L. Nguyen, M. Darman, A. Ireland, M. Fitzpatrick, A high performance liquid chromatography fluorescence method for the analysis of both pyridoxal-5-phosphate and thiamine pyrophosphate in whole blood, *Clinica Chimica Acta*, 506 (2020) 129-134.
- [61] Y.C. Huang, R.A. Gibson, T.J. Green, Measuring thiamine status in dried blood spots, *Clinica Chimica Acta*, 509 (2020) 52-59.
- [62] S. Armah, M.G. Ferruzzi, N. Gletsu-Miller, Feasibility of Mass-Spectrometry to Lower Cost and Blood Volume Requirements for Assessment of B Vitamins in Patients Undergoing Bariatric Surgery, *Metabolites*, 10 (2020) 10.
- [63] L. Feng, W.L. He, G.Q. Huang, S.S. Lin, C.X. Yuan, H.R. Cheng, J.C. He, Y.M. Liu, Reduced thiamine is a predictor for cognitive impairment of cerebral infarction, *Brain and Behavior*, 8.
- [64] D. Wells, *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation*, 1 ed., Elsevier Science 2003.
- [65] P. Roper, Walker, Ron, Barwick, Vicki J., Burke, Shaun, Bedson, Peter, Lawn, Richard, *Applications of Reference Materials in Analytical Chemistry*, 1 ed., Royal Society of Chemistry 2001.
- [66] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed?, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 1474-1482.

- [67] L.R. Snyder, Kirkland, Joseph J., Glajch, Joseph L., Practical HPLC Method Development, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Wiley-Interscience, 2012.
- [68] D. Shechter, What is the Purpose of Homogenization?, 2019.
- [69] S. Aldrich, Membrane Filters, 2020.
- [70] Novel dosage form ANalysis, in: J. Etse (Ed.) Separation Science and Technology, Elsevier 2011, pp. 225-249.
- [71] F.H. Stephenson, Calculations for Molecular Biology and Biotechnology, 3<sup>rd</sup> ed., 2016 2016.
- [72] Z.L. Niu, W.W. Zhang, C.W. Yu, J. Zhang, Y.Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, Trac-Trends in Analytical Chemistry, 102 (2018) 123-146.
- [73] B. Cervinkova, L.K. Krcmova, D. Solichova, B. Melichar, P. Solich, Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408 (2016) 2407-2424.
- [74] A.M.R. Afify, M.M. Rashed, E.A. Mahmoud, H.S. El-Beltagi, Effect of Gamma Radiation on Protein Profile, Protein Fraction and Solubility's of Three Oil Seeds: Soybean, Peanut and Sesame, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 39 (2011) 90-98.
- [75] P.L. Privalov, Cold denaturation of proteins, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 25 (1990) 281-305.
- [76] A. Schon, B.R. Clarkson, M. Jaime, E. Freire, Temperature stability of proteins: Analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry, Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 85 (2017) 2009-2016.
- [77] C. Polson, P. Sarkar, B. Incledon, V. Raguvaran, R. Grant, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 785 (2003) 263-275.
- [78] D. Matulis, Selective Precipitation of Proteins, Current Protocols in Protein Science, 83 (2016) 4.5.1-4.5.37.
- [79] T.M. Alshammari, A.A. Al-Hassan, T.B. Hadda, M. Aljofan, Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis, Saudi Pharmaceutical Journal, 23 (2015) 689-697.

- [80] J.H. Oh, Y.J. Lee, Sample Preparation for Liquid Chromatographic Analysis of Phytochemicals in Biological Fluids, *Phytochemical Analysis*, 25 (2014) 314-330.
- [81] Y.C. Shih, J.M. Prausnitz, H.W. Blanch, SOME CHARACTERISTICS OF PROTEIN PRECIPITATION BY SALTS, *Biotechnology and Bioengineering*, 40 (1992) 1155-1164.
- [82] J. Ma, J. Shi, H. Le, R. Cho, J.C.J. Huang, S. Miao, B.K. Wong, A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 862 (2008) 219-226.
- [83] R.A. Biddlecombe, S. Pleasance, Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 734 (1999) 257-265.
- [84] K. Ward, S.I. Cheng, D.C. Stuckey, Protein separation using non-ionic and cationic surfactant precipitation, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91 (2016) 2563-2567.
- [85] K.D. Clark, C. Zhang, J.L. Anderson, Sample Preparation for Bioanalytical and Pharmaceutical Analysis, *Analytical Chemistry*, 88 (2016) 11262-11270.
- [86] Z. Berk, Chapter 11 - Extraction, in: Z. Berk (Ed.) *Food Process Engineering and Technology* (Third Edition), Academic Press 2018, pp. 289-310.
- [87] G. Hendriks, D.R.A. Uges, J.P. Franke, Reconsideration of sample pH adjustment in bioanalytical liquid-liquid extraction of ionisable compounds, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 853 (2007) 234-241.
- [88] S. Steinborner, J. Henion, Liquid-liquid extraction in the 96-well plate format with SRM LC MS quantitative determination of methotrexate and its major metabolite in human plasma, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 2340-2345.
- [89] L. Krcmova, D. Solichova, P. Solich, Microplates in liquid chromatography - New solution in clinical research? - A review, *Talanta*, 115 (2013) 973-979.
- [90] J. Zweigenbaum, K. Heinig, S. Steinborner, T. Wachs, J. Henion, High throughput bioanalytical LC/MS/MS determination of benzodiazepines in human urine: 1000 samples per 12 hours, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 2294-2300.
- [91] I. Delgado-Blanca, E.J. Llorent-Martinez, A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, A new approach for automated liquid-liquid extraction in a sequential injection manifold, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 521-528.

- [92] K.S. Ask, T. Bardakci, M.P. Parmer, T.G. Halvorsena, E.L. Oiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129 (2016) 229-236.
- [93] Sample Preparation: An Analytical Perspective, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, %U <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471457817.ch12003>, pp. 1-36.
- [94] N.J.K. Simpson, *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, CRC Press 2000.
- [95] M.D.a.k. Lucie Nováková, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, Praha, 2013.
- [96] G. Ouyang, R. Jiang, *Solid Phase Microextraction: Recent Developments and Applications*, Springer Berlin Heidelberg 2016.
- [97] S. K., *Why Derivatize? Improve GC Separations with Derivatization*, 2010.
- [98] S.R. Liu, P.K. Dasgupta, Liquid droplet - a renewable gas sampling interface, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 2042-2049.
- [99] S.C.M.a.V. David, *Derivatization Methods in GC and GC/MS*, in: P. Kusch (Ed.) *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*, IntechOpen 2018.
- [100] K. Kankova, K. Kuricova, V. Dvorakova, L. Pacal, Z. Marcanova, J. Svojanovsky, J. Olsovsky, J. Belobradkova, J. Rehorova, Thiamine metabolism abnormalities contribute to the progression of diabetic nephropathy, *Diabetologia*, 57 (2014) S478-S478.
- [101] D. Tandel, P. Shah, K. Patel, V. Thakkar, T. Gandhi, Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction for Quantification of Febuxostat in Plasma Using RP-HPLC and Its Pharmacokinetic Application, *Journal of Chromatographic Science*, 54 (2016) 1827-1833.
- [102] G. Shao, J. Agar, R.W. Giese, Cold-induced aqueous acetonitrile phase separation: A salt-free way to begin quick, easy, cheap, effective, rugged, safe, *Journal of Chromatography A*, 1506 (2017) 128-133.
- [103] P.F. Chatzimichalakis, V.F. Samanidou, R. Verpoorte, I.N. Papadoyannis, Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, 27 (2004) 1181-1188.

- [104] C.M. Cho, J.H. Ko, W.J. Cheong, Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction, *Talanta*, 51 (2000) 799-806.
- [105] G. Mkrtchyan, V. Aleshin, Y. Parkhomenko, T. Kaehne, M.L. Di Salvo, A. Parroni, R. Contestabile, A. Vovk, L. Bettendorff, V. Bunik, Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Scientific Reports*, 5 (2015) 26.
- [106] E.M. Agency, Bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, 2015.
- [107] F.a.D. Administration, Bioanalytical Method Validation, in: C.f.D.E.a.R.C. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Veterinary Medicine (CVM) (Ed.) Guidance for Industry, 2018.
- [108] D.S. Flett, Principles and practices of solvent extraction. Second Edition, Revised and Expanded. Edited by J Rydberg, M Cox, C Musikas and GR Choppin. Marcel Dekker, New York, 2004. 760 pp, ISBN 0 8247 5053 2, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80 (2005) 359-360.
- [109] D.W. Tedder, Albright's Chemical Engineering Handbook, Liquid-Liquid Extraction., CRC Press, 2008, pp. 709–735.
- [110] M. Jowkarderis, F. Raofie, Optimization of supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample preparation method for determination of 4-nitrotoluene and 3-nitrotoluene in a complex matrix, *Talanta*, 88 (2012) 50-53.
- [111] K. Ahmadi, Y. Abdollahzadeh, M. Asadollahzadeh, A. Hemmati, H. Tavakoli, R. Torkaman, Chemometric assisted ultrasound leaching-solid phase extraction followed by dispersive-solidification liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in soil samples, *Talanta*, 137 (2015) 167-173.
- [112] S. Mylonaki, E. Kiassos, D.P. Makris, P. Kefalas, Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (2008) 977-985.
- [113] I. Yalin, S. Cehreli, A.E. Andreatta, A. Senol, Phase Equilibria of Ternary Liquid-Liquid Systems (Water+C1-C4 Monocarboxylic Acids plus Dibutyl Ether) at Three

- Different Temperatures: Modeling with A-UNIFAC, *Journal of Solution Chemistry*, 20.
- [114] P. Dhakal, S.N. Roese, E.M. Stalcup, A.S. Paluch, Application of MOSCED To Predict Limiting Activity Coefficients, Hydration Free Energies, Henry's Constants, Octanol/Water Partition Coefficients, and Isobaric Azeotropic Vapor-Liquid Equilibrium, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 63 (2018) 352-364.
  - [115] X.J. Qi, X.H. Li, H.Y. Yao, Y. Huang, X.Y. Cai, J.W. Chen, H. Zh, Predicting plant cuticle-water partition coefficients for organic pollutants using pp-LFER model, *Science of the Total Environment*, 725 (2020) 8.
  - [116] M.H. Abraham, W.E. Acree, Equations for the Transfer of Neutral Molecules and Ionic Species from Water to Organic phases, *Journal of Organic Chemistry*, 75 (2010) 1006-1015.
  - [117] M. Zawadzki, K. Paduszynski, M. Krolikowska, E. Grzechnik, COSMO-RS predicted 1-octanol/water partition coefficient as useful ion descriptor for predicting phase behavior of aqueous solutions of ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids*, 307 (2020) 8.
  - [118] A. Berthod, S. Carda-Broch, Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods, *Journal of Chromatography A*, 1037 (2004) 3-14.
  - [119] J. Fang, J.H. Wu, C.L. Li, H. Li, Q.S. Yang, Molecular design and comprehensive evaluation of solvents capable of simultaneously extracting multiple active substances, *Separation and Purification Technology*, 245 (2020) 12.
  - [120] C.E. Poulsen, R.C.R. Wootton, A. Wolff, A.J. deMello, K.S. Elvira, A Microfluidic Platform for the Rapid Determination of Distribution Coefficients by Gravity-Assisted Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 6265-6270.
  - [121] H.S. Shiran, M. Baghbanbashi, F.G. Ahsaie, G. Pazuki, Study of curcumin partitioning in polymer-salt aqueous two phase systems, *Journal of Molecular Liquids*, 303 (2020) 9.
  - [122] B. Faller, H.P. Grimm, F. Loeuillet-Ritzler, S. Arnold, X. Briand, High-throughput lipophilicity measurement with immobilized artificial membranes, *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005) 2571-2576.
  - [123] T. Yamashita, E. Yamamoto, I. Kushida, Frozen water phase method for log D measurement using a 96-well plate, *Talanta*, 84 (2011) 809-813.



- [124] M. Abolhasani, C.W. Coley, K.F. Jensen, Multiphase Oscillatory Flow Strategy for in Situ Measurement and Screening of Partition Coefficients, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 11130-11136.
- [125] V. Jagannadham, Linear Free Energy Relationships (LFER) as a One-Hour Classroom Lecture for Postgraduate Students: Correlation of the Nature of the Transition States, *Chemistry Education in the 1st Age*, (2009) 353-361.
- [126] M. Shalaeva, G. Caron, Y.A. Abramov, T.N. O'Connell, M.S. Plummer, G. Yalamanchi, K.A. Farley, G.H. Goetz, L. Philippe, M.J. Shapiro, Integrating Intramolecular Hydrogen Bonding (IMHB) Considerations in Drug Discovery Using Delta logP As a Tool, *Journal of Medicinal Chemistry*, 56 (2013) 4870-4879.
- [127] C. Yamagami, A. Hamasaki, Y. Kumagai, T. Moritoki, T. Tanahashi, Hydrogen-bonding abilities for phenols assessed by quantitative analyses of their partition coefficients derived from different partitioning systems, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53 (2005) 398-401.
- [128] A.M. Zissimos, M.H. Abraham, M.C. Barker, K.J. Box, K.Y. Tam, Calculation of Abraham descriptors from solvent-water partition coefficients in four different systems; evaluation of different methods of calculation, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, (2002) 470-477.
- [129] A. Rahimi, A. Ulbrich, J.J. Coon, S.S. Stahl, Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics, *Nature*, 515 (2014) 249-252.
- [130] S.R. Wang, Y.R. Wang, Q.J. Cai, X.Y. Wang, H. Jin, Z.Y. Luo, Multi-step separation of monophenols and pyrolytic lignins from the water-insoluble phase of bio-oil, *Separation and Purification Technology*, 122 (2014) 248-255.
- [131] W. Mu, H.X. Ben, A. Ragauskas, Y.L. Deng, Lignin Pyrolysis Components and Upgrading-Technology Review, *Bioenergy Research*, 6 (2013) 1183-1204.
- [132] J.X. Long, Y. Xu, T.J. Wang, R.Y. Shu, Q. Zhang, X.H. Zhang, J. Fu, L.L. Ma, Hydrothermal Depolymerization of Lignin: Understanding the Structural Evolution, *Bioresources*, 9 (2014) 7162-7175.
- [133] R. Katahira, A. Mittal, K. McKinney, X.W. Chen, M.P. Tucker, D.K. Johnson, G.T. Beckham, Base-Catalyzed Depolymerization of Biorefinery Lignins, *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 4 (2016) 1474-1486.
- [134] R. Rinaldi, R. Jastrzebski, M.T. Clough, J. Ralph, M. Kennema, P.C.A. Bruijninx, B.M. Weckhuysen, Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in

- Bioengineering, Biorefining and Catalysis, *Angewandte Chemie-International Edition*, 55 (2016) 8164-8215.
- [135] J.N. Putro, F.E. Soetaredjo, S.Y. Lin, Y.H. Ju, S. Ismadji, Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals, *Rsc Advances*, 6 (2016) 46834-46852.
- [136] J. Zakzeski, P.C.A. Bruijninx, A.L. Jongerius, B.M. Weckhuysen, The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals, *Chemical Reviews*, 110 (2010) 3552-3599.
- [137] F.G. Calvo-Flores, J.A. Dobado, Lignin as Renewable Raw Material, *Chemsuschem*, 3 (2010) 1227-1235.
- [138] M. Kleinert, T. Barth, Phenols from lignin, *Chemical Engineering & Technology*, 31 (2008) 736-745.
- [139] A. Garron, P.P. Arquilliere, W. Al Maksoud, C. Larabi, J.J. Walter, C.C. Santini, From industrial black liquor to pure phenolic compounds: A combination of catalytic conversion with ionic liquids extraction, *Applied Catalysis a-General*, 502 (2015) 230-238.
- [140] L.I. Grischechko, G. Amaral-Labat, A. Szczurek, V. Fierro, B.N. Kuznetsov, A. Celzard, Lignin-phenol-formaldehyde aerogels and cryogels, *Microporous and Mesoporous Materials*, 168 (2013) 19-29.
- [141] L.I. Grischechko, G. Amaral-Labat, A. Szczurek, V. Fierro, B.N. Kuznetsov, A. Pizzi, A. Celzard, New tannin-lignin aerogels, *Industrial Crops and Products*, 41 (2013) 347-355.
- [142] H.Z. Chen, Z.Y. Li, X.Y. Liu, Y.M. Tian, L. Yang, Z.C. Wang, Depolymerization of renewable resources-lignin by sodium hydroxide as a catalyst and its applications to epoxy resin, *Journal of Applied Polymer Science*, 132 (2015).
- [143] J. Ostergaard, S.H. Hansen, C. Larsen, C. Schou, N.H.H. Heegaard, Determination of octanol-water partition coefficients for carbonate esters and other small organic molecules by microemulsion electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, 24 (2003) 1038-1046.
- [144] A. Andres, M. Roses, C. Rafols, E. Bosch, S. Espinosa, V. Segarra, J.M. Huerta, Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76 (2015) 181-191.

- [145] J.Y. Pan, J. Fu, S.G. Deng, X.Y. Lu, Distribution coefficient of products from lignin oxidative degradation in organic-water systems, *Fuel Processing Technology*, 140 (2015) 262-266.
- [146] C. Numviyimana, T. Chmiel, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, Study of pH and temperature effect on lipophilicity of catechol-containing antioxidants by reversed phase liquid chromatography, *Microchemical Journal*, 145 (2019) 380-387.
- [147] S.H. Xu, B. Kropscott, Evaluation of the three-phase equilibrium method for measuring temperature dependence of internally consistent partition coefficients ( $k_{ow}$ ,  $k_{oa}$ , and  $k_{aw}$ ) for volatile methylsiloxanes and trimethylsilanol, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (2014) 2702-2710.
- [148] A. Noubigh, A. Mgaidi, M. Abderrabba, Temperature Effect on the Distribution of Some Phenolic Compounds: An Experimental Measurement of 1-Octanol/Water Partition Coefficients, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55 (2010) 488-491.
- [149] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chemical Reviews*, 71 (1971) 525-+.
- [150] G. Kortüm, W. Vogel, K. Andrussov, Dissociation constants of organic acids in aqueous solution, *Pure and Applied Chemistry*, 1 (1960) 187.
- [151] D.J. Murphy, Alkaloids, in: B. Thomas, B.G. Murray, D.J. Murphy (Eds.) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2017, pp. 118-124.
- [152] Alkaloid, *Encyclopædia Britannica*, *Britannica Academic*, 2020 URL: <https://academic-eb-com.eres.qnl.qa/levels/collegiate/article/alkaloid/5753>.
- [153] Z. Memariani, N. Gorji, R. Moeini, M.H. Farzaei, Chapter Two - Traditional uses, in: S.M. Nabavi, I. Suntar, D. Barreca, H. Khan (Eds.) *Phytonutrients in Food*, Woodhead Publishing 2020, pp. 23-66.

## 9. PRÍLOHY

### Publikácie uvedené v dizertačnej práci

**Príloha I: Jenčo J.**, Krčmová Kujovská L., Solichová D., Solich P., Recent trends in determination of thiamine and its derivatives in clinical practice, Journal of Chromatography A, 1510 (2017), 1-12, Q1, IF<sub>2019</sub> = 4,049

**Príloha II:** Tshepelevitsh S., Hernits K., **Jenčo J.**, Hawkins J.M., Muteki K., Solich P., Leito I., Systematic Optimization of Liquid-Liquid Extraction for Isolation of Unidentified Components, ACS Omega, 2 (2017), 7772-7776, Q2, IF<sub>2019</sub> = 2,870

**Príloha III: Jenčo J.**, Krčmová Kujovská L., Sobotka L., Bláha V., Solich P., The development of the liquid chromatography method for the clinical monitoring of vitamin B1 metabolites and B6 status in whole blood, Talanta, 211 (2020), 120702, Q1, IF<sub>2019</sub> = 5,339

**Príloha IV:** Breiterová K., Koutová D., Maříková J., Havelek R., Kuneš J., Majorošová M., Opletal L., Hošťálková A., **Jenčo J.**, Řezáčová M., Cahlíková L., Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from Narcissus L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity, Plants, 9 (2020), 137, Q1, IF<sub>2019</sub> = 2,632

**Príloha V:** Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Kohelová E., De Simone A., Al Mamun A., Hulcová D., Marková J., Kučera T., Jun D., Šafratová M., Maříková J., Andrisano V., **Jenčo J.**, Kuneš J., Martinez A., Nováková L., Cahlíková L., Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimers disease, Bioorganic chemistry, 100 (2020), 103928, Q1, IF<sub>2019</sub> = 4,831

**Príloha VI:** Program vyvinutý pomocou prediktívneho algoritmu

**Príloha VII:** Kompletný set logD/logP hodnôt s odhadom neistoty